

動物組織由来水溶性エラスチンの精製及び応用に関する基礎研究

著者	井上 亜沙子
その他のタイトル	Basic study on industrial application of water-soluble elastin from animal tissue and synthetic elastin-like peptide
学位授与年度	平成29年度
学位授与番号	17104甲情工第327号
URL	http://hdl.handle.net/10228/00006802

動物組織由来水溶性エラスチンの精製及び 応用に関する基礎研究

井上 亜沙子

目次

論文概要	4
略語一覧	7
第1章 序論	8
1-1. エラスチンの特徴	9
1-2. エラスチン研究の歴史	11
1-3. 弾性線維とエラスチンの定義	12
1-4. 水溶性エラスチンの精製	14
1-5. 水溶性エラスチンの性質	15
1-6. コアセルベーション特性とアミノ酸組成	16
1-7. エラスチンを利用した応用研究	17
1-7-1. 生理活性に基づく応用	17
1-7-2. バイオマテリアルへの応用	18
1-8. 本研究の目的	19
第2章 動物組織からの水溶性エラスチンの精製とその応用.....	20
2-1. Introduction	21
2-2. Materials	22
2-3. Methods	23
2-3-1. 動物組織からの水溶性エラスチンの精製	23
2-3-1-1. ブタ大動脈脱脂組織からの水溶性エラスチンの精製	23
2-3-1-2. マグロ動脈球組織からの水溶性エラスチンの精製	24
2-3-2. 水溶性エラスチンの精製及び精製物に対する改良	24
2-3-2-1. 脱塩方法の検討	25
2-3-2-2. ブタ由来水溶性エラスチンのコアセルベーション法による分画	26
2-3-3. 水溶性エラスチンの基礎評価	27
2-3-3-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布の確認	27
2-3-3-2. アミノ酸組成の評価	27
2-3-3-3. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価	27
2-3-4. 水溶性エラスチンの素材としての応用検討	28
2-3-4-1. ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験	28
2-3-4-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験	28

2-3-4-3. γ 線照射によるナノ粒子化及び粒子測定	29
2-4. Results	30
2-4-1. 水溶性エラスチンの収量・収率	30
2-4-2. 水溶性エラスチンの分子量分布	31
2-4-3. 水溶性エラスチンのアミノ酸組成	33
2-4-4. ブタ由来水溶性エラスチンの分画における収量・収率および分子量分布	37
2-4-5. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価	38
2-4-6. ヒト 3 次元培養表皮に対する保湿性の評価	40
2-4-7. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性の評価	42
2-4-8. γ 線照射によるナノ粒子化	43
2-4-8-1. γ 線照射に用いる試料のコアセルベーション能	43
2-4-8-2. 粒子径のサイズ	45
2-5. Discussion	47
第 3 章 動物組織からの有用成分の抽出とその応用	53
3-1. Introduction	54
3-2. Materials	55
3-3. Methods	55
3-3-1. 動物組織からの有用成分の抽出	55
3-3-1-1. ブタ大動脈組織からの有用成分の抽出	55
3-3-1-2. マグロ動脈球組織からの有用成分の抽出	56
3-3-2. 有用成分の基礎評価	56
3-3-2-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布の確認	56
3-3-2-2. アミノ酸組成の評価	56
3-3-2-3. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価	56
3-3-2-4. ヒアルロン酸定量	57
3-3-2-5. ラミニン定量	57
3-3-3. 有用成分の応用検討	57
3-3-3-1. ヒト 3 次元培養表皮を用いた保湿性試験	57
3-3-3-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験	57
3-4. Results	58
3-4-1. 有用成分の収量及び収率	58
3-4-2. 有用成分の分子量分布	58
3-4-3. 有用成分のアミノ酸組成	59
3-4-4. 濁度測定におけるコアセルベーション能の評価	61
3-4-5. 有用成分中のヒアルロン酸及びラミニン量	62

3-4-6. ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験	64
3-4-7. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験	65
3-5. Discussion.....	66
第4章 エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの応用.....	69
4-1. Introduction	70
4-2. Materials	70
4-3. Methods	71
4-3-1. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの 濁度測定におけるコアセルベーション能の評価	71
4-3-2. 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する相互作用の確認	71
4-3-3. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの応用	71
4-3-3-1. ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験	71
4-3-3-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験	72
4-3-3-3. 温度応答性培養皿の作製	72
4-3-3-4. γ 線照射によるナノ粒子化及び粒子径測定	72
4-4. Results	72
4-4-1. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの 濁度測定によるコアセルベーション能の評価	72
4-4-2. 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する相互作用の確認	73
4-4-3. ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験	74
4-4-4. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験	75
4-4-5. 温度応答性培養皿からの細胞シートの回収	76
4-4-6. γ 線照射により得られたナノ粒子の粒子径	77
4-5. Discussion.....	78
第5章 結論	80
謝辞	83
参考文献	84

論文概要

エラスチンは細胞外マトリックスの一種で、生体組織において大動脈をはじめ、項靱帯、皮膚、子宮、弾性軟骨、黄色靱帯などの弾性が必要な組織や臓器に不溶性タンパク質として存在している。エラスチンの最も重要な機能は弾性能の発現であり、これらの組織に適切な割合で存在し弾力性を与えている。20 世紀半ばから、エラスチンを生体組織から可溶化する試みが行われるようになり、現在までに種々の検討が行われている。エラスチンの構造上の特徴として、架橋領域と疎水性領域が交互に配置されていることが挙げられる。疎水性領域には様々なアミノ酸の繰り返し配列が存在するが、その中でも Val-Pro-Gly-Val-Gly (以下 VPGVG と略) からなるペンタペプチドの繰り返し配列は、コアセルベーションとよばれる温度依存的な分子の自己集合・解離の性質を有し、エラスチンの弾性機能の発現に重要な配列である。また、Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (以下 VGVAPG と略) からなるヘキサペプチド配列は、線維芽細胞やマクロファージ等多くの細胞の増殖及び遊走を促進することが報告されている。エラスチンのアミノ酸組成は、動物種によって違いがあるものの、疎水性アミノ酸の含有量が多く、エラスチンの架橋に関与するデスモシン、イソデスモシンが存在する。これらのアミノ酸は、エラスチンにのみ存在しているため、エラスチンにおける指標アミノ酸とされている。

上記のような特徴を有することから、エラスチンは様々な素材としての応用が期待されている。例えば、動物組織から精製したエラスチンは、我々の健康や生活の質を向上させる健康食品や化粧品素材として利用され始めている。しかしながら、その科学的根拠などを示した研究は非常に少ない。一方、エラスチンの弾力性やコアセルベーションなどの性質に着目し、医療分野への応用が期待されているが、未だ研究段階であり実用化には至っていない。その理由として、VPGVG の繰り返し配列を用いた Poly(VPGVG) は、高いコアセルベーション能を有するため、ドラッグデリバリーシステム (以下 DDS と略) の担体をはじめ広く研究されているが、それらに使用されている繰り返し回数は、少なくとも 40 回以上であり、素材を作製する上で技術面、コスト面における問題がある。そこで、当研究室ではエラスチン様ペンタペプチドの 1 位のアミノ酸残基の疎水度を向上させることにより、高いコアセルベーション能を有する短鎖型自己集合性ペプチドの開発を行ってきた。

本研究では、天然からの動物組織由来エラスチン、化学合成したエラスチン様ペプチドの 2 種類のエラスチンについて、応用への利用を目標とした基礎検討を実施した。

第1章では、エラスチンのコアセルベーション能と構造に関する一般的な知見、バイオマテリアルへの応用研究について述べ、本研究の重要性について記載した。

第2章では動物組織から水溶性エラスチンを精製し、精製方法の改良を行った。また精製した水溶性エラスチンに関して分子量分布、アミノ酸組成、コアセルベーション能の基礎的評価を行い、素材としての応用検討を行った。動物組織から水溶性エラスチンを精製する方法として熱アルカリ処理法を用い、アルカリ溶液を中和する際に生じる塩を除去するため、これまで透析を行ってきた。この操作は極めて単純であるが、時間を要し、透析膜の孔の大きさ以下の分子量サイズが除去されてしまうという問題があった。そこで、オクタデシルシリル基 (C18) が充填された固相カラム (Sep-Pak®) を用いた新たな脱塩方法について検討を行った結果、水溶性エラスチンの脱塩において充分利用可能であった。素材への応用として、まず水溶性エラスチンの化粧品としての応用に対して、3次元培養表皮を用いた保湿性試験及びシミや雀斑の原因物質であるメラニン生成に関与する酵素であるチロシナーゼの阻害を検討した。その結果、水溶性エラスチンは、3次元培養表皮中の皮膚内含水率の向上に寄与し、マッシュルーム由来チロシナーゼに対して穏やかな阻害能を示した。これにより、水溶性エラスチンが保湿剤や美白剤といった基礎化粧品の素材として有用であることが示された。次に、バイオマテリアルとしての応用に対して安定した粒子を作製するため、 γ 線を照射することで分子間架橋を行った。これにより安定したナノ粒子が得られる可能性が見出され、将来的に DDS における担体への有用性が示唆された。

第3章では、新たな素材として、動物組織より水溶性エラスチンを含んだ有用成分の抽出方法を考案した。新たな抽出方法によって得られた成分について、水溶性エラスチンとの比較を行ったところ、抽出された成分には、コラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニンが含まれていることが分かった。得られた有用成分について、水溶性エラスチンと同様に基礎化粧品の素材としての応用を考え、3次元培養表皮を用いた保湿性試験およびマッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行った。その結果、保湿性では水溶性エラスチンよりも低かったが、マッシュルーム由来チロシナーゼに対しては阻害能が向上した。また、有用成分の抽出方法は、水溶性エラスチン精製における工程を単純化するだけであり、操作の簡便化と効率化がなされた。これらのことから、動物組織からの有用成分の抽出は、将来的に健康食品や化粧品素材として十分応用可能であると示唆された。

第4章では、当研究室で開発したフェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドである $\text{H-(FPGVG)}_5\text{-NH}_2$ (以下 (FPGVG)_5 と略) の応用について検討を行った。まず、基礎的な評価としてコアセルベーション能を確認した。溶媒を生体条件下と同様の生理食塩水でコアセルベーションの測定を行ったところ、溶媒が水の場合と比較してコアセルベーション能が向上することが示された。次に、エラスチン様ペプチドのバイオマテリアルへの応用を考え、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (以下 NHDF と略) に対する相互作用を評

価した。その結果、(FPGVG)₅はNHDFに対して、毒性などを示さないことが確認された。続いて、化粧品素材としての応用を考え3次元培養表皮に対する保湿性試験及びマッシュルーム由来チロシナーゼ阻害試験を行った。その結果、3次元培養表皮に対する保湿性は動物由来水溶性エラスチンや有用成分と比較すると低いものの、濃度0%（コントロール）との間に有意な差が見られた。マッシュルーム由来チロシナーゼに対しても同様に、僅かながら阻害活性を示した。次に、細胞組織工学における温度応答性培養皿への利用を目指した検討を行った。通常、細胞培養において細胞を回収する際、トリプシンなどの酵素処理を行う。しかし、温度応答性培養皿は、酵素を用いることなく、温度処理（培養温度よりも温度を下げる）のみで細胞を回収することを可能とする。そのため、細胞と細胞との結合を保持したままの細胞シートを得ることができることから、再生医療の分野において大きく貢献する素材となりうる。そこで、(FPGVG)₅の温度依存的なコアセルベーション特性を利用し、温度応答性培養皿の作製検討を行った。その結果、温度処理のみで培養皿上から細胞の剥離が確認された。また、DDS担体の作製検討として γ 線照射することにより(FPGVG)₅は、粒子径が500 nm程度の安定したナノ粒子の作製に成功した。

最後に第5章を結論とし、本研究の成果をまとめた。

本研究では、動物組織由来水溶性エラスチンの精製方法、将来的な応用を見据えた科学的根拠の実証、さらに水溶性エラスチンを含む有用成分の抽出方法の確立を行った。また、エラスチン様合成ペプチドに対する応用検討を行い、エラスチンが素材として十分に使用可能であることを示す様々な知見を得ることができた。

略語一覽

DDS	Drug Delivery System
Des	Desmosine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOPA	3, 4-Dihydroxy-L-Phenylalanine
D.W.	Distilled Water
FBS	Fetal Bovine Serum
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hyp	Hydroxyproline
Ide	Isodesmosine
LabCyte	LabCyte EPI-MODEL 12
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
TFA	Trifluoroacetic Acid
Ala (A)	Alanine
Gly (G)	Glycine
Phe (F)	Phenylalanine
Pro (P)	Proline
Val (V)	Valine

第 1 章

序論

1-1. エラスチンの特徴

エラスチンはゴムのように伸縮性に富む一方、張力に対する抵抗性はコラーゲンに比べて極めて弱いという特徴を有している。また、ウラン-鉛染色後の電子顕微鏡写真では、弾性線維は染色性に乏しく均一無構造の中心部（amorphous component）と周囲の電位密度の高い微細繊維（microfibril）から構成されている。エラスチンは不溶性タンパク質であり、可溶化液として容易に抽出することができないことから、可溶性タンパク質であり可溶化液が抽出できるコラーゲンと比べて、著しく研究が遅れている。両者は、あらゆる組織・臓器において共存しており、これらのタンパク質がどのように存在するかによって臓器の機能や病態が規定されている。例えば、皮膚において、若者では真皮浅層まで線維成分が分布しており、鮮やかな紅色の膠原線維と共に表皮に対して平行に走る弾性線維が認められる。一方、高齢者では表皮下は拡大し、線維成分は少なく、弾性線維は糸くず状で、かつ表皮に対して垂直に分布している [1]。

生体においてエラスチンの含有量が多いのは、大動脈に代表される弾性型動脈である。弾性線維は帯状-板状を呈し、多数の小孔（fenestration）が認められ、有窓弾性板とよばれている。健常者では、弾性線維と平滑筋細胞が交互に配列することにより明瞭な層構造が形成されており、その間に僅かな膠原線維が介在している（Fig. 1） [1]。弾性線維（エラスチン）は、全身諸臓器の機能や病態に深く関わっており、基礎・臨床を問わず多くの研究がなされてきたが、エラスチン新生や代謝に関しては、未だに不明な点が多く残されている。

エラスチンのアミノ酸組成は Gly、Ala、Val、Pro が構成アミノ酸の 80% 以上を占め、特に Gly 量は全体の約 1/3 である。さらにエラスチン特有の架橋アミノ酸として、デスマシン（Desmosine；以下 Des と略）やイソデスマシン（Isodesmosine；以下 Ide と略）が含まれている。ヒドロキシプロリン（Hydroxyproline；以下 Hyp と略）は、コラーゲンに比べごくわずかであり [2]、Met は存在しない [3、4]。

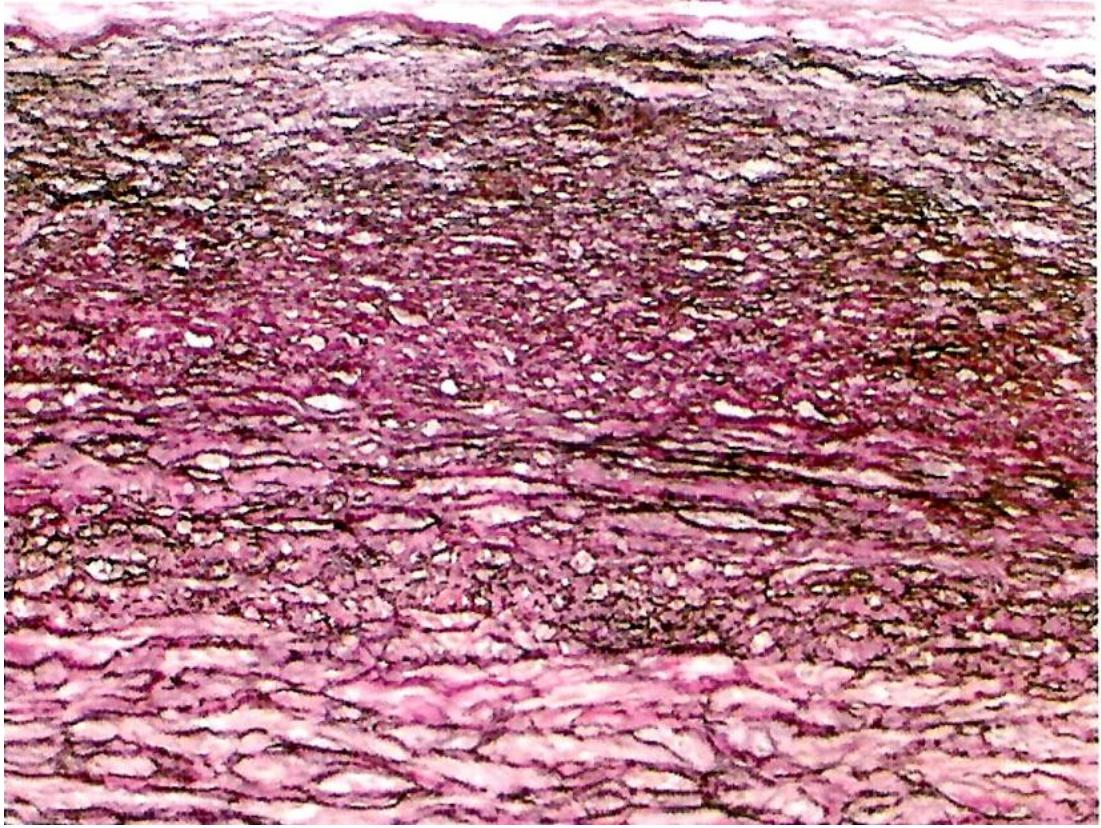


Fig. 1. 大動脈の光学顕微鏡（Elastica van Gieson stain）[1]
弾性線維（褐色）と平滑筋細胞（黄色）が交互に配列しており、明瞭な層板構造（lamellar structure）が認められる。

1-2. エラスチン研究の歴史

エラスチンは光学顕微鏡を使用することでしかその存在を確認することができなかったが、1902 年にエラスチンが煮沸処理に抵抗し残渣として残ることが初めて報告された [5]。そして、1930 年代には研究の対象となり、現在に至るまで約 80 年以上が経過した。エラスチン研究の始まりは、生体内の疾患における弾性組織の変化を明らかにするため形態学的な研究であった [6]。1941 年に Lowry らによって組織からエラスチンを可溶化する試みが成され [7]、その後 Lancing らの改良により hot-alkali 法が開発された [8]。さらに、Partlidge らが熱シュウ酸処理により可溶性のエラスチンペプチドを得ることに成功し、コアセルベーション能の有無で α -エラスチンと β -エラスチンに分類した [9]。

Loyd and Garrod は X 線解析を用いエラスチンの構造がゴム様構造に類似することを明らかにし [10]、1963 年に Thomas、Partlidge らがエラスチンに特有な架橋アミノ酸であるデスモシンとイソデスモシンを発見した [11]。1969 年には、Sandberg らがトロポエラスチンを銅欠乏ブタの大動脈から単離した [12]。このエラスチンの前駆物質であるトロポエラスチンが得られるようになり、エラスチン新生過程に関する研究は飛躍的に発展した。特に、Ross らを中心にエラスチンの生合成過程におけるミクロフィブリルの役割が明らかとされた。1971 年、Ross and Bornstein らによってエラスチン新生におけるミクロフィブリルの役割が示された [13]。1970 年代は、分子生物学的手法の開発・発展とともにエラスチンに関する遺伝子の検索が急速に発展した。1984 年、Laboratory Investigation にエラスチンの生合成過程が詳細に掲載されているが [14]、その内容は 20 年以上経っても大きな変化はない。1987 年、Idik らはヒトのエラスチン遺伝子の全構造を明らかにし [15]、1989 年には Mecham らによりエラスチンに対して特異的に結合し、細胞内に情報伝達を行うエラスチンレセプターを単離した [16]。1990 年、Foster はラットに IGF-1 を連続注入し、IGF-1 がエラスチン遺伝子の発現を促すことを *in vivo* で証明した [17]。そして、遺伝子技術の発達から Mecham らや Weiss らが、大腸菌組換えによってトロポエラスチンを作製し、上述したような弾性線維やエラスチン線維の形成過程の研究が進んでいる [18]。また、生体内のエラスチンペプチドを模倣した合成ペプチドが数多く作製され、生理活性機能及び弾性機能の解明に対して研究が行われている [19]。

1-3. 弾性線維とエラスチンの定義

弾性線維とは形態学上用いられる言葉であり、結合組織に板状、線維状、紐状に存在する線維で、“弾性線維に特異的な染色法で染色され、その他の膠原線維などからその染色性を区別される線維”のことを指す[3]。通常、弾性線維染色には **Elastica van Gieson**、**Verhoeff hematoxin**、**Resorcin-fuchsin**、**orcein** 染色などがある。これらの染色で弾性線維は不定形、波形に染色される。組織を伸展すると波形は消え、代わりに偏光が増加する。電子顕微鏡写真では、弾性線維は膠原線維に見られるような周期構造を持たず、大きさ、形に至るまでいかなる特徴も有さない。弾性線維は、主に弾性作用の芯になるエラスチンと、線維のネットワークを作る微細線維であるマイクロフィブリルから構成されている。“エラスチン”のみを指す場合、この弾性線維の中に含まれるマイクロフィブリル以外の“不溶性タンパク質”を指す。

エラスチンは血管、靱帯、肺、皮膚など、ほぼ全身の臓器・組織に分布する。すなわち心臓（心外膜、心内膜、弁）、消化器（食道、結腸、胆嚢）、眼球、生殖器（子宮、膣）、泌尿器（尿管、膀胱）、耳鼻咽喉（耳介、上顎洞、唾液腺）、乳腺、胸腺、リンパである。これらの臓器は、循環、呼吸、吸収、排泄、分泌など生体における固体（食物、便）、気体（空気、ガス）、液体（血液、分泌液）の運搬に関与している。エラスチンは、これらの臓器の基本的機能に関連する弾性の保持に寄与している。弾性線維は、発生の段階での形成において異常が生じた場合、各器官の機能が正常に成長するよう働く。しかし弾性線維形成後では、糖化の過程で種々の因子の蓄積による弾性線維の破壊、変性、修復の異常が起これば、器官は形態が変化し、機能が低下してしまう [3]。

Table 1. 弾性線維とエラスチンの定義 [3]

名称	定義
弾性線維	弾性線維特異染色にて染色される線維 (抗エラスチン抗体免疫染色を含む)
エラスチン	トロポエラスチンが架橋して作られた不溶性タンパク質
トロポエラスチン	エラスチンの前駆タンパク質
水溶性エラスチン (エラスチンペプチド)	不溶性エラスチンを可溶化したもの α-エラスチン：シュウ酸処理で可溶化（高分子） β-エラスチン：シュウ酸処理で可溶化（低分子） κ-エラスチン：アルカリ+エタノールで可溶化 エラスターゼ処理：通常好中球エラスターゼで消化 エラスチンペプチド：ペンタペプチド、ヘキサペプチド、 各エクソンなど

組織において、特に肺や血管、靱帯などは弾性組織とよばれ、弾力性（張力に対する抵抗）を示すことでその機能を発揮している。これらの組織の弾力性は弾性線維が担っている。各組織に含まれるエラスチンの質量は、皮膚の真皮では2 - 3%に留まるが、肺で約 20%、動脈で 28 - 32%、靱帯では 70%に及ぶ。生体内においてエラスチンは、可溶性の前駆体タンパク質であるトロポエラスチンが、高度に架橋したポリマーとして存在する。トロポエラスチンは血管平滑筋細胞や線維芽細胞で生合成され、細胞外へと分泌される。その後ミクロフィブリルの周囲や間隙に集合整列し、酵素リジルオキシダーゼにより分子間で適切に架橋されて網目構造を持つ不溶性の弾性タンパク質エラスチンとなる（Fig. 2）。正常なエラスチンの形成には、このトロポエラスチンの規則的な自己集合が重要である。この自己集合を“コアセルベーション”とよび、エラスチンの弾性機能の発現にも深く関与していることが知られている [3、4]。

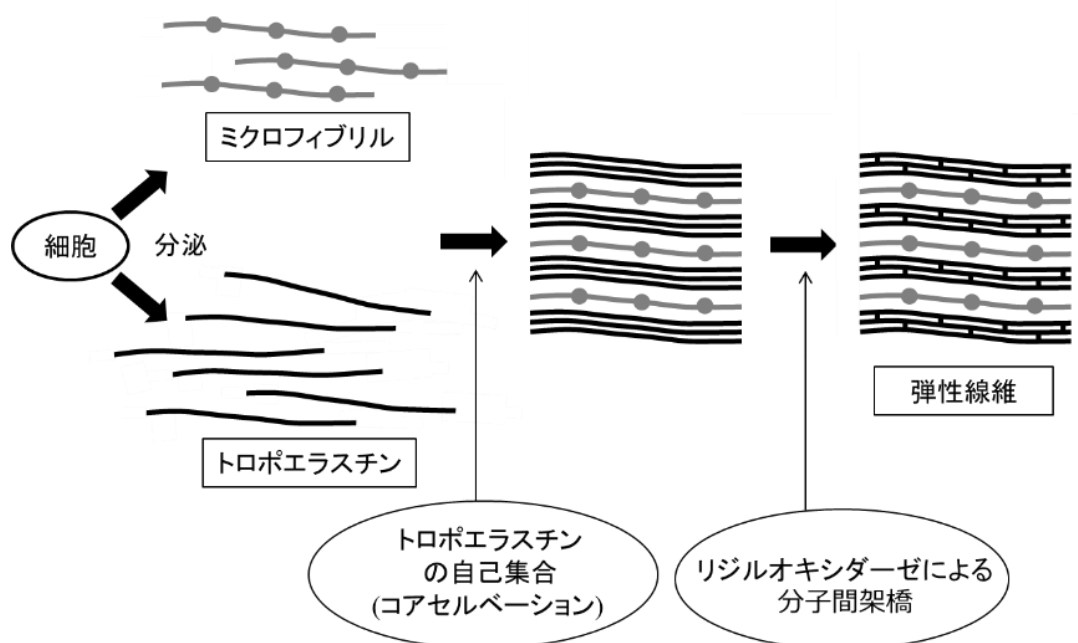


Fig. 2. 生体内における弾性線維の形成 [19]

1-4. 水溶性エラスチンの精製

エラスチンの構造と機能を分子レベルで解明することは、エラスチンが不溶性のため困難である。哺乳類や鳥類の組織から、種々の操作で溶け出してくる物質を除いた最終の不溶性残渣を一般にエラスチンと称している。この操作において最も困難な除去物質は、エラスチンと共に弾性線維を構成するミクロフィブリル（システイン及び極性アミノ酸、特に酸性アミノ酸に富む）である。古くから、種々の精製方法が開発されてきたが、Lowry ら [7] 及び Lancing ら [8] の熱アルカリ抽出法（0.1 N NaOH、98℃、45 分）が現在でも広く用いられている。この方法の利点は、簡便で比較的高純度のエラスチンが得られることであるが、過酷なためにエラスチンの分解を引き起こす欠点がある。この欠点を解消する方法として、Partridge [9] らはオートクレーブ処理法を考案したが、この方法では組織の種類によりミクロフィブリルの除去が不完全となる。次いで Miller と Fullmer [20] は、5 M グアニジン塩酸抽出後のコラゲナーゼ消化法を考案し、Ross と Bornstein [21] は、5 M グアニジン塩酸にジチオエリスリトールを還元剤として添加する方法を見出し、ミクロフィブリルの除去を容易にした。さらに Richmond [22] は、5 M グアニジン塩酸の代りに 6 M 尿素を使用する方法を考案し、Rasmussen [23] らはエラスチン中にメチオニンが存在しないことに注目し、5 M グアニジン塩酸抽出後のギ酸-BrCn 法を開発した。Sarafini-Fracassini [24] らは、エラスチンを分解する恐れのない高純度コラゲナーゼを使用して純度の高いエラスチンを精製した。

一般に、成熟した大動脈や項靱帯、肺などの組織からエラスチンを精製する場合、元来エラスチン含有量が多いため、上述した方法は十分有用である。しかしながら、エラスチン含有量が低くミクロフィブリル含有量が圧倒的に多い未熟な組織からエラスチンを精製する場合、従来の方法では非常に困難である [25-27]。しかし、上村ら [28] は受胎後 40 週齢のヒト新生児肺から、脱脂後、大量の 1 M NaCl を使用し不純物を徹底して除去することにより、従来、困難であった未熟組織から高純度なエラスチンを単離している。今までに多くの研究者によって、高純度のエラスチンを精製する試みがなされてきたが、明確な基準は定められていなかった。近年では、エラスチンが健康食品などの素材として市場に多く出回るようになった。そこで、2012 年に日本健康・栄養食品協会より「認定健康食品（JHFA）解説書：エラスチン食品」[29] が発行され、「エラスチン食品」の基準が設けられた。哺乳類由来では、「エラスチンに特有のアミノ酸であるデスモシンとイソデスモシンの合計がモル相対比で 0.2%（重量比で 1.0%）、魚由来ではモル相対比で 0.04%（重量比で 0.2%）以上含むことが“エラスチン”である」とされている。

1-5. 水溶性エラスチンの性質

トロポエラスチンや高分子が含まれる水溶性エラスチンの水溶液は、低温 (25℃以下) では透明な均一溶液であるが、温度を体温 (37℃) 以上に上げていくと、分子が自己集合し溶液は白濁する。この溶液をそのままの状態で放置すると、分子をわずかしき含まない透明な平衡溶液 (上層) と分子が濃縮された淡黄色の粘性のあるコアセルベート層 (下層) の二層に分離する。この過程は可逆的であり、温度を 25℃以下に冷却すると再び元の透明な均一溶液となる (Fig. 3)。この可逆的な自己集合の特性が“コアセルベーション”であり、正常なエラスチンの線維形成、さらには弾性機能の発現に重要な性質である [3、4]。この現象は分光学的には吸光度計を用いて、可視領域の波長における吸光度を測定することで評価することができ、この方法を濁度測定とよぶ。温度が上昇し、溶液が白濁した状態を光学顕微鏡により観察すると、エラスチンペプチドが集合したナノオーダーサイズの“液滴”を観察することができる [1]。

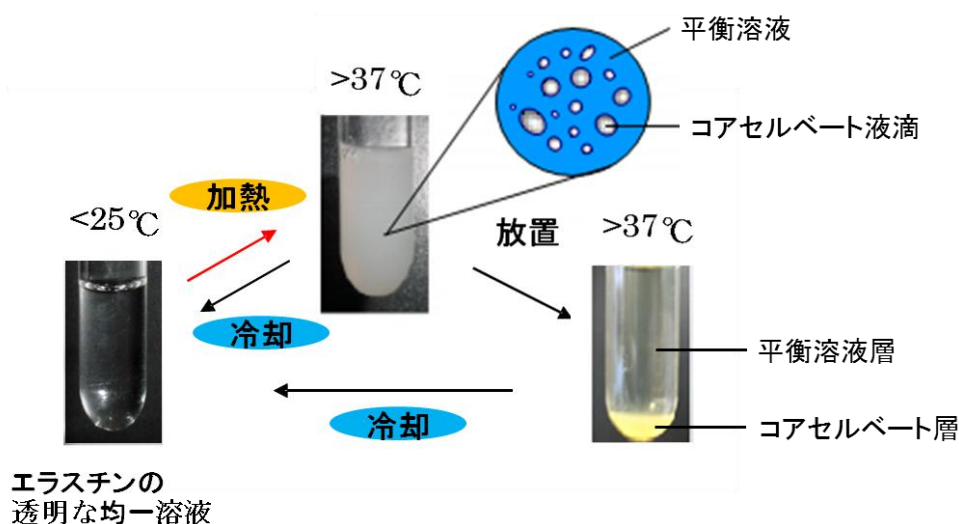


Fig. 3. 試験管内における水溶性エラスチンのコアセルベーション特性

また、水溶性エラスチンは細胞遊走作用を有し、単球・マクロファージに対して遊走活性を有することが報告されている [30-32]。遊走には、細胞内の cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化と cGMP の上昇が関与し [31、32]、これらの作用は非インテグリン型のエラスチンレセプターを介していることが分かっている。細胞接着については、未だ詳細は解明されていないが、エラスチンの細胞接着性を示唆する報告がなされている [33]。

1-6. コアセルベーション特性とアミノ酸組成

Val-Pro-Gly-Xaa-Gly から成るエラスチン様ポリペンタペプチド($V^1P^2G^3X^4G^5$)_n は、コアセルベーションを示すモデルペプチドとして広く研究されている。ここで、配列中の 4 位の Xaa (以下 X^4 と略) のアミノ酸側鎖の性質がコアセルベーションに大きく影響を与える事が知られている [34-36]。

また、これまでに poly(VPGVG) の各アミノ酸残基のコアセルベーションへの寄与を調べる目的で、C 末端より 1 残基ずつアミノ酸を除去した poly(VPGV)、poly(VPG)、N 末端を除去した poly(PGVG) が合成され、これらのポリペプチドのコアセルベーション特性および分子構造が報告されている [37]。ポリペンタペプチドアナログの構造解析より、コアセルベーション開始には Val¹-Pro² 側鎖間の疎水相互作用により安定化した Pro²-Gly³ をコーナーにもつ β-ターン構造を縁に持ち、その β-ターンが繰り返して配置された β-スパイラルが、Val¹ 及び Val⁴ の側鎖の分子間疎水相互作用によって自己集合することが必須であることが示された [38、39]。VPGVG 配列の 3 位の Gly³ を Ala に置換した poly(VPAVG) では、自己集合の開始温度はあまり変化しないが、昇温と降温が一致せず、不完全可逆的なコアセルベーション特性を示すことが報告されている [40、41]。

コアセルベーション特性はアミノ酸組成の他に、ペプチドの鎖長にも影響を受けることが報告されており [36、41]、同じユニットでは鎖長 (繰り返し回数) が大きいほどコアセルベーションの開始温度は低温側へシフトする。

1-7. エラスチンを利用した応用研究

1-7-1. 生理活性に基づく応用

エラスチンは、組織の弾性に関与しており、健康と美容に直接的に関係が深いタンパク質である [42]。しかし、老化などを始めとする様々な要因によって生体組織中の含量が減少してしまう [43]。このため、生体組織中のエラスチン含量を増やすことが健康的な生活の維持につながると考えられており、近年では水溶性エラスチンを摂取することによる健康への好影響の報告がなされてきた [44]。同様に、肌質が改善されることが多数報告されており、単なる健康増進作用のみならず、美容における効果も期待される [45、46]。そのため、健康維持のための健康食品や化粧品素材としての応用がなされるようになった。エラスチンと同様に細胞外マトリックス成分であるコラーゲンは、生体組織に剛性を与える要素であり、市場における認知度が高く、化粧品素材において保湿効果を発揮する素材として使用されている。この保湿効果を発揮する保湿剤は、皮膚表面の水分を調整し潤いのあるしっとり感を与える目的で配合される。皮膚の構造において外界と接している角質層の水分量は、皮膚の健康維持や様々な刺激に対する防御機能と密接に関係し、皮膚の老化防止、潤い、滑らかさなどに重要な役割を果たしている。角質層の水分保持は、天然保湿因子（NMF）と皮脂膜によってコントロールされているが、老化や外界からの刺激などで容易にその機能が低下する。このため、化粧品でその保湿成分を補うことは、基礎化粧品の大切な効能の一つである。保湿成分としては、生体成分と同じか類似の成分が注目され応用されている。皮膚最外層の角層はバリア機能を有し、分子量 500 以上のものが角質層内部へ浸透することはないが、皮膚表面を湿り気のある膜で覆うことにより、角質層内部からの水分蒸発を抑えることができる。近年では、可溶化技術の進歩によりエラスチンもコラーゲンと同様化粧品素材として使用され始め、保湿剤として効果が期待されている。化粧品は、その機能に応じて医薬部外品薬用化粧品として効果を標榜することができ、その一つが日焼けによる色素沈着防止、すなわち美白化粧品である。近年、美白効果を謳った商品が多く出回っているが、白斑問題などにより安全性の高い天然素材に関する研究が盛んに行われている [47]。肌の色や透明感と深く関わっているのがメラニンである。メラニンは、皮膚や髪などをはじめ、動植物中に広く分布し、皮膚の基底層に存在するメラノサイト中のメラノソームに存在する膜結合型の糖タンパク質であるチロシナーゼ酵素によって、チロシンが酸化され、ドーパ、インドキノンを経て酸化的に重合し生合成される。メラニン自体は紫外線を吸収し生体防御の役割を担っているが、過剰に生成されるとシミやくすみの原因となるため、チロシナーゼの活性を抑制することにより、美白へと繋がる [48]。近年では、エラスチンを配合した化粧品などが数多く見られるようになった。エラスチンは、生体内に分布しているタンパク質であるため、その安全性に関しては問題無いと考えられるが、化粧品素材としての基礎的知見に関する報告は少ない。

1-7-2. バイオマテリアルへの応用

エラスチン様ペプチドについては制御可能なコアセルベーション能の他、生体適合性を有しているため様々なバイオマテリアルへの応用も期待されている。中でもDDS用の担体としての利用について、着目されている。現在の薬物療法では、薬物の定期的な服用や注射による投与が主流であるが、副作用発現の可能性が問題となることが多い。この問題を改善するために注目されているのがDDSである。DDSとは、医薬品を体内に必要な場所に必要な量を必要な時間だけ作用させることで副作用を軽減し、医薬品をより効果的に使用できるようにするものである [49]。DDS用の担体として使用される物質の多くは、生分解性や生体適合性に優れたものである。DDSの具体的な技術としては、毎時間一定量の薬物を生体内へ放出する放出制御などが挙げられる [50]。

また、組織工学における分野では細胞シート工学への利用も検討されている [51]。従来の細胞回収方法では蛋白質分解酵素を用いるため、細胞と培養皿間の結合だけではなく細胞及び細胞外マトリックスまでも損なわれてしまう。そこで温度応答性培養皿の開発によりこの問題は解決され、細胞をシート状に回収することが可能となった。温度応答性培養皿には、温度変化によって、表面の性質が変化するポリアクリルアミド類のポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) がコーティングされている。37℃では表面が疎水性になり細胞が接着・増殖する。その後、20℃まで下げると表面は親水性になり細胞と細胞の接着がなされたシート状のまま回収することができる。この原理は、エラスチンの有するコアセルベーションに類似しており、その応用が期待される。

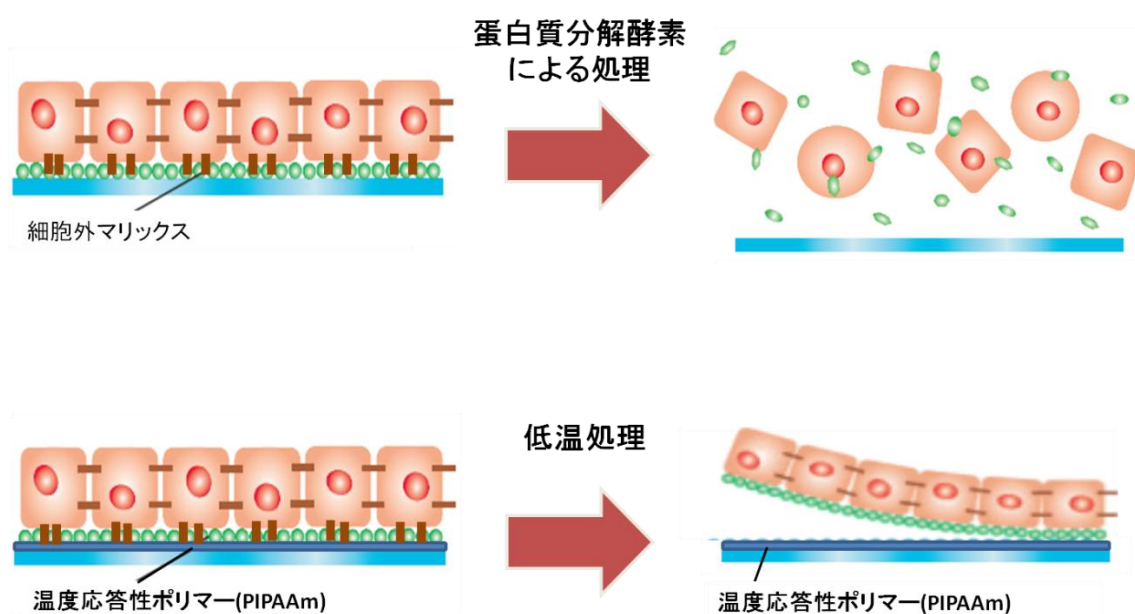


Fig. 4. 温度変化による細胞シートの回収 [52]

1-8. 本研究の目的

エラスチンは、現在、健康食品や化粧品分野ではコラーゲンやヒアルロン酸に次ぐ有望な素材として注目されており、市場に出回るようになってきた。しかしながら、素材としての科学的根拠を示す研究例は少ない。また、動物組織からの精製方法についても様々な方法が存在し、エラスチン精製における効率化・簡便化を図ることは、今後のエラスチン研究に対して大きく貢献することができる。

そこで、第2章では動物組織から水溶性エラスチンを精製し、その精製方法の改良を目的とした。精製物に対して、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布の確認、アミノ酸分析によるアミノ酸組成の評価、濁度測定によるコアセルベーション能の評価を行い、水溶性エラスチンにおける精製の効率化・簡便化を評価した。得られた水溶性エラスチンについて、ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行い、化粧品素材としての有用性を評価した。さらに、 γ 線照射によるナノ粒子化を行った。

第3章では、水溶性エラスチン精製方法における更なる簡便化を図ると共に、動物組織内に存在するエラスチン以外の有用成分にも着目し、エラスチンを含む有用成分を抽出する検討を行った。得られた抽出成分について、水溶性エラスチンとの比較を行い、エラスチン以外の有用成分が含まれていることを確認した。

また、エラスチンはそのユニークな自己集合・解離の性質からバイオマテリアルや組織工学など多方面への応用が期待されている。第4章では、当研究室において開発されたフェニルアラニン含有短鎖型自己集合性ペプチドに着目し、素材としての評価を行った。まず、フェニルアラニン含有短鎖型自己集合性ペプチドのコアセルベーション特性を濁度測定により測定した。また、化粧品素材としての応用を考え、ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行った。さらに、バイオマテリアルの素材として温度応答性培養皿への応用、 γ 線照射によるナノ粒子化の作製を行った。

上記のように本研究では、天然からの動物組織由来水溶性エラスチン、化学合成したエラスチン様ペプチドの2種類のエラスチンについて、応用への利用を目標とした基礎検討を実施した。

第 2 章

動物組織からの水溶性エラスチンの 精製とその応用

2-1. Introduction

第1章でも述べたように、エラスチンは脊椎動物に広く分布しており、哺乳動物では項靱帯、大動脈、肺などに多く含まれている [3、4]。また、ヒトの皮膚にもコラーゲンと共に存在し、肌の弾力性に重要な働きをしている。これまでウシの項靱帯がエラスチンの原料として利用されてきた。しかし、2000年代初頭に牛海綿状脳症（BSE）発生後、ウシ由来エラスチンに対する安全性が懸念され始めた。そこで、同じ哺乳類の中で食用としても使用されているブタが原料として注目されるようになった。ブタは首が短いため、項靱帯組織が少ない。そのため、直径が 1.5 - 3.0 cm あり、ヒトの大動脈に最も近いと言われている大動脈がエラスチンを抽出する材料として用いられるようになった。ブタの大動脈は、食用としても利用されているが、多くが廃棄物として処分されるため、ブタの利用価値を向上させるという点で意義がある。

また、ヒトとの感染症の症例が無くアレルギー性が低いとされる海洋素材についても注目されている。例えば魚類由来コラーゲンは、健康食品や化粧品材料として既にシェアを広げており、その他細胞培養に用いる足場といったバイオマテリアルへの応用研究や使用もなされている [53]。過去の報告から、魚類の各組織におけるアミノ酸組成を比較したところ、動脈球という組織のみにエラスチン特有の架橋アミノ酸である Des、Ide の分布が認められた [53、54]。動脈球（Fig. 5-B）とは、魚類（硬骨魚）特有の組織であり、心臓の心室から血管へ至る動脈幹で弾力性に富んでいる。内部は海綿状構造で構成され、心臓からの血流により常に拡張と収縮を繰り返している。そして、この弾力性によりえら毛細血管にかかる血圧を調整し、かつ血流を維持する働きを担っている。また、組織電顕の結果、免疫染色により動脈球には 70 - 80% のエラスチン（弾性線維）が含まれていることが報告されている [55]。

水溶性エラスチンの精製と可溶化方法については、第1章で述べたように多くの検討がなされている。第2章では、まず精製方法の改良と精製物に対する品質改良を目的とし、水溶性エラスチンを精製した。そして、得られた水溶性エラスチンの基礎評価を行い、素材については化粧品素材として、またバイオマテリアルにおける DDS 担体としての応用に関する評価を行った。



Fig. 5. ブタ大動脈組織（A）とマクロ動脈球組織（B） [55]

2-2. Materials

Acetic Acid (特級)	和光純薬工業株式会社
Acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用)	和光純薬工業株式会社
Desmosine	MP Biomedicals, LLC.
DOPA (D9628-5G)	Sigma-Aldrich
Gel Filtration Standard	Bio-Rad
Isodesmosine	MP Biomedicals, LLC.
LabCyte	株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
L-ヒドロキシプロリン標準品	和光純薬工業株式会社
Methanol (一級)	和光純薬工業株式会社
Sep-Pak [®] Vac 35cc (10 g) C18 Cartridges	ウォーターズ株式会社
Spectra/Por [®] 3,500 cut	Spectrum Laboratories
TFA (特級)	和光純薬工業株式会社
Tyrosinase from mushroom (T3824-25KU)	Sigma-Aldrich
アミノ酸混合標準液 H 型	和光純薬工業株式会社
塩酸 (HCl) (容量分析用)	和光純薬工業株式会社
塩化ナトリウム (NaCl) (特級)	和光純薬工業株式会社
ブタ真皮由来コラーゲンパウダー	株式会社 E&C ヘルスケアより提供
水酸化ナトリウム (NaOH) (特級)	和光純薬工業株式会社
ファームエラスチン [®]	株式会社 E&C ヘルスケアより提供
ブタ大動脈脱脂組織	株式会社 E&C ヘルスケアより提供
マグロ動脈球組織	株式会社 E&C ヘルスケアより提供
マグロ動脈球由来水溶性エラスチン	株式会社 E&C ヘルスケアより提供
リン酸水素二ナトリウム・12 水 (特級)	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素ナトリウム 二水和物 (特級)	和光純薬工業株式会社

2-3. Methods

2-3-1. 動物組織からの水溶性エラスチンの精製

エラスチンを素材とする応用研究を実施するためには、まず生体組織から水溶性のエラスチンを精製することが必須である。本研究では、ブタ大動脈組織あるいはマグロ由来動脈球を使用し水溶性エラスチンの精製を行った。第1章に記述したように、エラスチン精製方法は、数多くの方法が存在する。本研究では熱アルカリ処理法 [43] に基づいて種々の検討を行った。

2-3-1-1. ブタ大動脈脱脂組織からの水溶性エラスチンの精製

エラスチン以外の可溶性タンパク質の除去を目的として、まずブタ大動脈脱脂組織 (10 g) に対して 10 倍容量の 1.0 M NaCl (100 mL) を加え 25°C で 15 分間攪拌した。そして、7.5 倍容量の 0.1 M NaOH (75 mL) を加えさらに 100°C で 10 分間攪拌した後、ろ過を行い溶液の除去を行った。残った組織に対して再び 7.5 倍容量の 0.1 M NaOH (75 mL) を加え、予熱で 1 分間攪拌した後、ろ過を行い溶液の除去を行い、残った組織をブタ大動脈組織由来不溶性エラスチンとして得た。次いで、5 倍容量の 0.2 M NaOH (50 mL) を加え 100°C で 120 分間攪拌した後、氷で急冷し酢酸を用いて中和 (pH 6.5) した。この操作の際に生成された中和塩を除去するために、透析膜 (Spectra/Por® 3,500 cut) を用い電気導電率が 0 になるまで脱塩を行った (Fig. 6-A)。

ブタ大動脈 (脱脂組織)

- ↓試料の 10 倍量の 1.0 M NaCl を加え攪拌 (室温、15 分間)
- ↓試料の 7.5 倍量の 0.1 M NaOH を加え攪拌 (100°C、15 分間)
- ↓濾過
- ↓試料の 7.5 倍量の 0.1 M NaOH を加え攪拌 (予熱、1 分間)
- ↓濾過

ブタ大動脈由来不溶性エラスチン

- ↓試料の 5 倍量の 0.2 M NaOH を加え攪拌 (100°C、120 分間)
- ↓氷で急冷
- ↓酢酸を用いて中和 (pH 6.5)
- ↓透析膜 (Spectra/Pore® 3,500 cut) を用いて脱塩 (4°C、4 日間)
- ↓凍結乾燥

ブタ大動脈由来水溶性エラスチン

Fig. 6-A. ブタ大動脈組織からの水溶性エラスチン精製スキーム

2-3-1-2. マグロ動脈球組織からの水溶性エラスチンの精製

エラスチン以外の可溶性タンパク質の除去を目的として、まずマグロ動脈球組織（10 g）に対して2倍容量の1.0 M NaCl（20 mL）を加え65℃で5分間攪拌した。さらに2倍容量の0.03 M NaOH（20 mL）を加え5分間攪拌した後、ろ過を行い溶液の除去を行った。残った組織に対して再び2倍容量の0.1 M NaCl（20 mL）を加え、65℃で5分間攪拌し、さらに2倍容量の0.03 M NaOH（20 mL）を加え5分間攪拌した後、ろ過を行い溶液の除去を行い、残った組織をマグロ動脈球由来不溶性エラスチンとして得た。次いで、2倍容量の0.1 M NaOH（20 mL）を加え100℃で80分間攪拌した後、氷で急冷し酢酸を用いて中和（pH 6.5）した。この操作の際に生成された中和塩を除去するために、透析膜（Spectra/Por[®] 3,500 cut）を用い電気導電率が0になるまで脱塩を行った（Fig. 6-B）。

マグロ動脈球組織

- ↓試料の2倍量の1.0 M NaClを加え攪拌（65℃、5分間）
- ↓試料の2倍量の0.03 M NaOHを加え攪拌（65℃、5分間）
- ↓濾過
- ↓試料の2倍量の0.1 M NaClを加え攪拌（65℃、5分間）
- ↓試料の2倍量の0.03 M NaOHを加え攪拌（65℃、5分間）
- ↓濾過

マグロ動脈球由来不溶性エラスチン

- ↓試料の2倍量の0.1 M NaOHを加え攪拌（100℃、80分間）
- ↓氷で急冷
- ↓酢酸を用いて中和（pH 6.5）
- ↓透析膜（Spectra/Pore[®] 3,500 cut）を用いて脱塩（4℃、4日間）
- ↓凍結乾燥

マグロ動脈球由来水溶性エラスチン

Fig. 6-B. マグロ動脈球組織からの水溶性エラスチン精製スキーム

2-3-2. 水溶性エラスチンの精製及び精製物に対する改良

エラスチンの素材としての応用、特に健康食品や化粧品を考えたとき、精製のスケールや簡便性といった課題をクリアすることが必要となる。そこで、水溶性エラスチンの精製方法及び精製物の分画に対する検討を行った。

2-3-2-1. 脱塩方法の検討

前述した動物組織からの水溶性エラスチンの精製方法（2-3-1-1、2-3-1-2）と同様の方法を用い、脱塩方法における検討を行った。まず、動物組織から不溶性エラスチンを得た後、熱アルカリ処理を行い酢酸にて中和を行った。そして、この中和の操作において生成された中和塩を除去するために、これまで用いてきた透析膜（Spectra/Por® 3,500 cut）に加え、オクタデシルシリル基（C18）が重鎮された固相抽出カラムである Sep-Pak®（溶出液；5% CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA：95% CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA=50：50）を使用した。操作の詳細は、Fig. 7-A、B に示した。

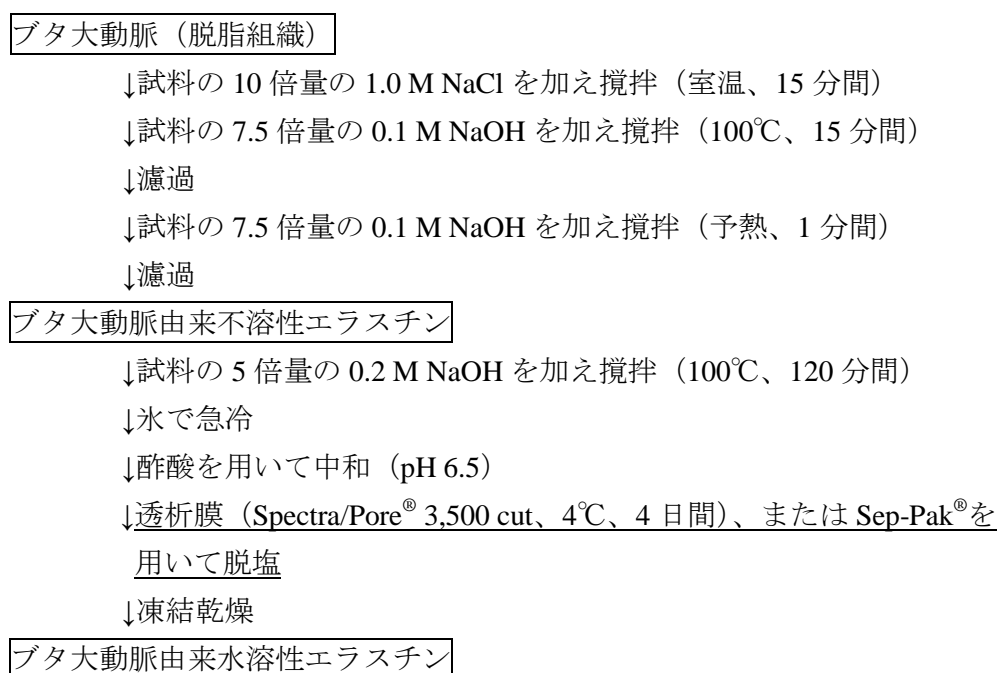


Fig. 7-A. ブタ大動脈脱脂組織からの水溶性エラスチン精製における脱塩方法の検討スキーム

マグロ動脈球組織

- ↓試料の 2 倍量の 1.0 M NaCl を加え攪拌 (65°C、5 分間)
- ↓試料の 2 倍量の 0.03 M NaOH を加え攪拌 (65°C、5 分間)
- ↓濾過
- ↓試料の 2 倍量の 0.1 M NaCl を加え攪拌 (65°C、5 分間)
- ↓試料の 2 倍量の 0.03 M NaOH を加え攪拌 (65°C、5 分間)
- ↓濾過

マグロ動脈球由来不溶性エラスチン

- ↓試料の 2 倍量の 0.1 M NaOH を加え攪拌 (100°C、80 分間)
- ↓氷で急冷
- ↓酢酸または塩酸を用いて中和 (pH 6.5)
- ↓透析膜 (Spectra/Pore® 3,500 cut、4°C、4 日間)、または Sep-Pak® を用いて脱塩
- ↓凍結乾燥

マグロ動脈球由来水溶性エラスチン

Fig. 7-B. マグロ動脈球組織からの水溶性エラスチン精製における脱塩方法の検討スキーム

2-3-2-2. ブタ由来水溶性エラスチンのコアセルベーション法による分画

水溶性エラスチンの分子量は、低分子から高分子まで幅広く分布している。そこで、簡易的に大きく 2 つの画分に分画し、それぞれがどのような活性を示すかを検討した。工業的に製造されたブタ由来水溶性エラスチンであるファームエラスチン®を、温度に対して可逆的な性質であるコアセルベーションによって 2 つの画分に分画した。ファームエラスチン®がコアセルベーションを示す濃度 (160 mg/mL) に D.W.で調製し、65 - 75°Cの湯浴で温め 2 層に分離 (コアセルベーション) させた。その後、遠心分離 (5,000 rpm、2 分、40°C) により上清 (画分 1) と沈殿 (画分 2) に分離し、凍結乾燥を行った (Fig. 8)。

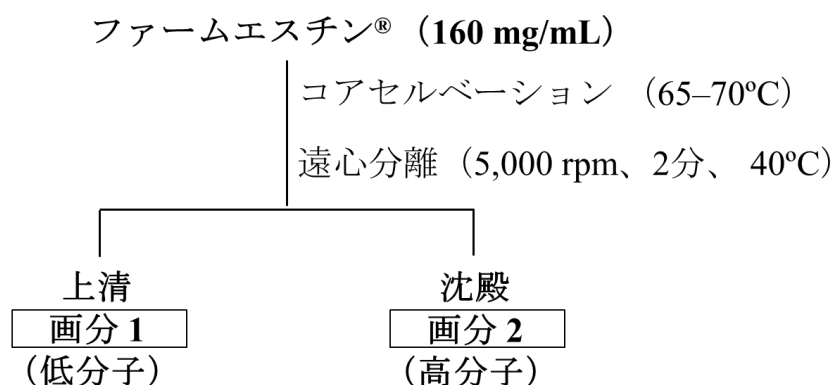


Fig. 8. コアセルベーション法による分画スキーム

2-3-3. 水溶性エラスチンの基礎評価

動物組織から精製した水溶性エラスチンについて、分子量の分布、アミノ酸組成、濁度測定によるコアセルベーション能における基礎評価を行った。

2-3-3-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布の確認

HPLC (1220 Infinity LC System (Agilent Technologies, CA, USA)) において TSK gel G2000 SW_{XL} カラム (7.8×300 mm, 5 μm; Tosoh Co., Tokyo, Japan) を使用し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量分布を確認した。溶離液として 0.3 M NaCl を含んだ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.9) を用い、流速 0.2 mL/min、波長 220 nm、試料の濃度は 1.0 mg/mL (溶媒 ; D.W.) で分析を行った。標準試料として、分子量 1,350–670,000 が混合された標準試薬 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を使用した。

2-3-3-2. アミノ酸組成の評価

試料を 6 M HCl で濃度 1.0 mg/mL へ調製し減圧下で N₂ 置換を行い、110°C で 48 時間加水分解を行った。その後、6 M HCl を N₂ にて風乾させ、0.02 M HCl で再び溶解させた。そして、日立高速アミノ酸分析計 L-8900 (Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan) によってアミノ酸分析を行った。

2-3-3-3. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価

試料を D.W. によって種々の濃度に調製し、コアセルベーション能の有無を確認した。測定にはペルチェ式温度コントローラー付き分光光度計 (JASCO: V-560, JASCO Co., Tokyo, Japan) を用いて温度変化率 0.5°C/min、波長 400 nm、N₂ 気流下において吸光度の変化を測定し濁度測定を行った。測定温度は 5 - 65°C の間で、温度上昇・降下におけ

る測定を行った。また、水溶性エラスチンをブタ真皮由来コラーゲン（株式会社 E&C ヘルスケア社製；以下 E&C 社製と略）と混合した場合のコアセルベーション能を確認するため、各々の混合物における濁度測定も行った。この際、温度上昇のみの測定を行った。

2-3-4. 水溶性エラスチンの素材としての応用検討

上記の基礎検討をもとに、水溶性エラスチンが素材として応用可能かを下記の 3 項目に渡り応用検討を行った。

2-3-4-1. ヒト 3 次元培養表皮を用いた保湿性試験

ヒト 3 次元培養表皮は、LabCyte EPI-MODEL 12（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング、以下 LabCyte と略す）を用いた。試料を用いて試料濃度 0.02%、0.1%、1.0% (w/w) に調製した。試験は、試料溶液の複数回適用の検討を行った。まず、LabCyte の培養皮膚上に試料溶液または対照の溶液（D.W.）を 200 μ L 適用し、培養皮膚を 32°C に保温した恒温振盪器に 30 分間放置した。皮膚表面の溶液を除去した後に、32°C で 1 時間乾燥した。ここまですを 1 サイクルとして、この操作を合計 3 サイクル繰り返した。その後、培養カップから皮膚のみを取り出し、電子天秤により湿重量を測定した。最後に、皮膚を 60°C 以上 80°C 以下に保った乾燥機で 24 時間乾燥し、電子天秤により乾燥重量を測定した。同様にして濃度調製に用いた D.W. を培養皮膚上に適用し、対照実験（コントロール）とした。以下の式により、皮膚内含水率を求めた。また、Dunnett 検定を用いた有意差検定を行い、 $P < 0.05$ の時に有意差があるとした。なお、工業的に製造されたブタ由来水溶性エラスチン（ファームエラスチン[®]）を試料として用いる際には、オクタデシルシリル基（C18）が充填された Sep-Pak[®] を使用し前処理を行った。

$$\text{皮膚内含水率 (\%)} = \frac{\text{湿重量} - \text{乾燥重量}}{\text{湿重量}} \times 100$$

2-3-4-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験

酵素反応は 96 穴マイクロプレートにて行った。マイクロプレートの各ウェルに 1/15 M リン酸緩衝液（pH 6.8）100 μ L、40 U/mL チロシナーゼ（マッシュルーム由来）溶液 40 μ L、D.W. で調製した濃度 1.0 mg/mL あるいは 10、20 mg/mL の阻害剤溶液 20 μ L を加え充分混合攪拌し 25°C で 3 分間プレインキュベートした。その後基質として 2.5 mM DOPA 50 μ L を添加した。添加後直ちに 490 nm における吸光度（As 0）を測定し、更に 25°C で 10 分間反応をさせ、再度吸光度（As 10）を測定した。試料溶液 20 μ L の代わり

に D.W. 20 μ L を加えた系 (Ab)、及び酵素溶液 40 μ L の代わりに緩衝液 40 μ L を加えた系 (Ac) において同様に反応させ、それぞれの場合における反応開始直後および 10 分後の吸光度 (Ac 0、Ac 10 及び Ab 0、Ab 10) を測定した。この時の吸光度測定にはマイクロウェルプレート測定用全自動比色計 (バイオテック ; ImmunoMini NJ-2300) を使用し、基質溶液の光酸化を防ぐ為、遮光した状態で実験を行った。チロシナーゼ阻害活性は以下の式により算出した。また、Dunnett 検定を用いた有意差検定を行い、 $P < 0.05$ の時に有意差があるとした。なお、工業的に製造されたブタ由来水溶性エラスチン (ファームエラスチン®) を試料として用いる際には、オクタデシルシリル基 (C18) が重鎮された Sep-Pak® を使用し前処理を行った。

$$\text{チロシナーゼ阻害率 (\%)} = 100 - \frac{(\text{As } 10 - \text{Ab } 10) - (\text{As } 0 - \text{Ab } 0)}{(\text{Ac } 10 - \text{Ac } 0)} \times 100$$

2-3-4-3. γ 線照射によるナノ粒子化及び粒子測定

大阪府立大学産官学研究所の ^{60}Co γ 線照射施設にて γ 線照射を行った。照射前に Table 2 の温度に設定した恒温槽を利用し、試料溶液の分子が集合し白濁した状態つまりコアセルベーションをしている状態にした。そして、コアセルベーションの状態が継続する温度の湯を入れた魔法瓶に移した。その後、 γ 線を 2 時間で 10 kGy 照射した。試料には、マグロ動脈球由来水溶性 (E&C 社製)、あるいは本研究で精製したブタ大動脈由来水溶性エラスチンとブタ真皮由来コラーゲン (E&C 社製) を用いたエラスチンとコラーゲンの混合物を使用した。ブタ大動脈由来水溶性エラスチンとブタ真皮由来コラーゲンとの混合物については、 γ 線照射前後における粒子径の測定を行った。 γ 線照射時の条件を Table 2 に示した。 γ 線照射前後の試料溶液は、それぞれ温度が 5°C とコアセルベーションを行う温度条件下で Zeta Potential/Particle Sizer (NICOMP™ 380 ZLS) により粒子径を測定した。

Table 2. 使用した試料と γ 線照射時の条件

試料	Ela:Col	濃度 (mg/mL)	加熱温度 (°C)
マグロ動脈球由来水溶性エラスチン	—	10	
	1:1	10	
ブタ大動脈由来水溶性エラスチン (Ela) と	1:4	25	40
コラーゲン (Col) の混合物	1:5	10	
	1:5	25	
	1:50	25	60

Ela ; Elastin Col ; Collagen

2-4. Results

2-4-1. 水溶性エラスチンの収量・収率

動物組織から透析で脱塩を行い精製された水溶性エラスチンの収量・収率について、Table 3 に示した。また、異なる脱塩方法によって得られたブタ大動脈由来水溶性エラスチンおよびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの収量・収率を、それぞれ Table 4、5 に示した。

Table 3 よりマグロ動脈球よりもブタ大動脈の方が、精製される水溶性エラスチンの収量が多い傾向が見られた。次に、Table 4 より異なる脱塩方法において得られたブタ大動脈由来水溶性エラスチンを比較すると、これまで用いてきた透析よりも Sep-Pak[®]の方が高い収量・収率であった。そして、Table 5 においても同様の結果であり、透析よりも Sep-Pak[®]における収量・収率が高い値であった。

Table 3. 動物組織由来水溶性エラスチンの収量・収率

由来	使用した重量(g)	収量 (g)	収率 (%) *
ブタ大動脈	10	1.84	18.4
マグロ動脈球	10	0.86	8.6

*収率は、使用した重量に対する収量の割合を算出した。

Table 4. 脱塩方法の検討において得られたブタ大動脈由来水溶性エラスチンの収量・収率

脱塩方法	使用した重量(g)	収量 (g)	収率 (%) *
透析	3.33	0.299	9.97
Sep-Pak [®]	3.33	0.368	12.3

*収率は、使用した重量に対する収量の割合を算出した。

Table 5. 脱塩方法の検討において得られたマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの収量・収率

脱塩方法	使用した重量(g)	収量 (g)	収率 (%) *
透析	9.00	1.36	15.1
Sep-Pak [®]	1.00	0.174	17.4

*収率は、使用した重量に対する収量の割合を算出した。

また可溶化には組織を 10 g 使用し、得られた可溶化液の 1/10 量を Sep-Pak[®]に使用した。

2-4-2. 水溶性エラスチンの分子量分布

ゲルろ過クロマトグラフィーによって、得られた動物組織由来水溶性エラスチンの分子量分布を Fig. 9 - 11 に示した。Fig. 9 - 11 中の標準試料の溶出時間は、左から (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビタミン B₁₂ (分子量 1,350) である。

Fig. 9 より、ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンは、分子量約 1,350 から 670,000 にかけて幅広く分布した。各々の分子量を比較するとブタ大動脈由来では、670,000 以上が 9.82% 存在し、マグロ動脈球由来では 5.26% であった。しかしながら、44,000 以上の分子量で各々を比較すると、ブタ大動脈由来とマグロ動脈球由来はそれぞれ 42.84%、52.81% であり、マグロ動脈球由来における割合の方がわずかに高い比率であった。

異なる脱塩方法で精製したブタ大動脈由来水溶性エラスチンの分子量分布を Fig. 10 に示す。Fig. 10 (a) は分子量 1,350 から 670,000 にかけて分布し、同様の方法で精製した Fig. 9 (a) と同様の分子量の幅で分布したが、各分子量分布の割合が異なった。異なる脱塩方法における分子量分布の割合を比較すると、Sep-Pak[®]における分子量が大きく異なり、670,000 付近の分子量が観察されなかった。透析における最大のピークが 52 分であり、そのときの分子量約 4,200 以上がそれぞれ 70.49%、48.97%、52.69% であり、透析において最も高い値であった。

異なる脱塩方法で精製したマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの分子量分布を Fig. 11 に示す。Fig. 11 (a) は分子量 1,350 から 670,000 にかけて分布し、同様の方法で精製した Fig. 9 (b) と同様の分子量の幅で分布したが、各分子量分布の割合が異なった。異なる脱塩方法における透析、Sep-Pak[®]の分子量分布の割合を比較すると、Sep-Pak[®]では透析において見られた分子量 670,000 付近のピークが減少し、比較的透析の方が高分子量の分布が高かった。透析における最大のピークが 48 分であり、そのときの分子量約 9,500 以上がそれぞれ 71.73%、60.71% であり、透析の方が高い値であった。

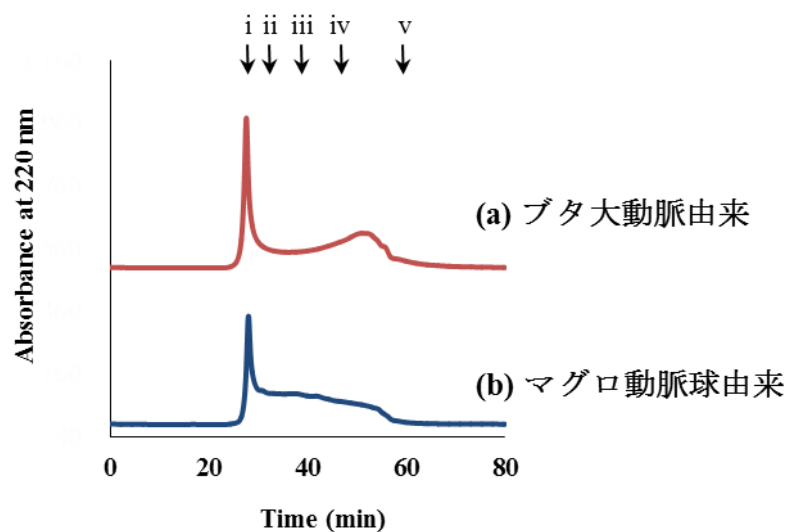


Fig. 9. 動物組織由来水溶性エラスチンのゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布
標準試料: (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、
(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビ
タミン B₁₂ (分子量 1,350)

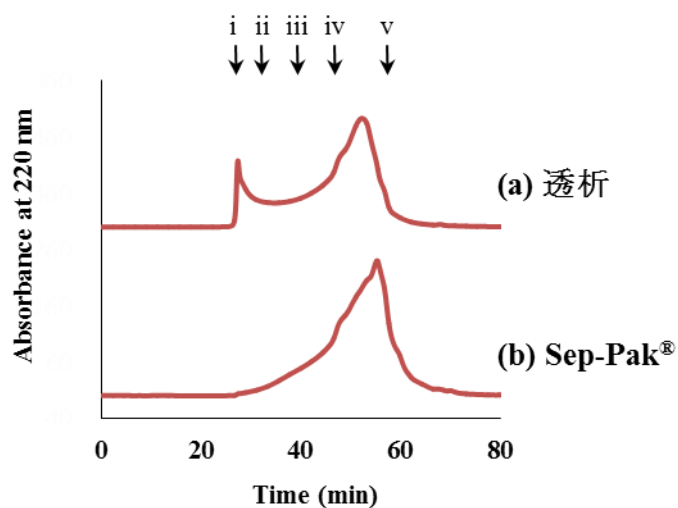


Fig. 10. 脱塩方法が異なるブタ大動脈由来水溶性エラスチンの
ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布
標準試料: (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、
(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビ
タミン B₁₂ (分子量 1,350)

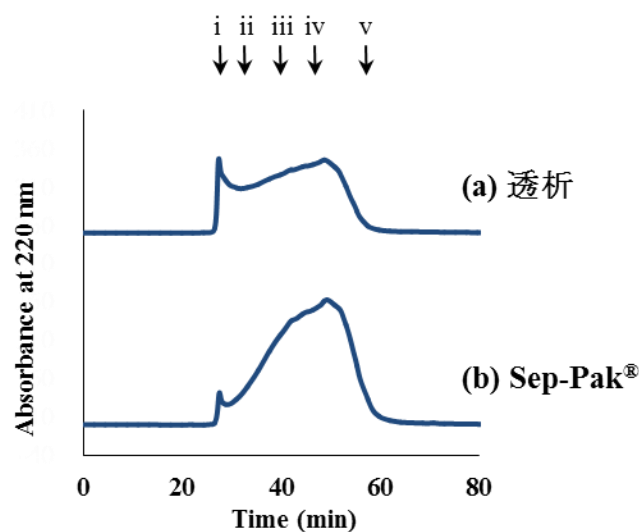


Fig. 11. 脱塩方法が異なるマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの
ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布

標準試料: (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、
(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビ
タミン B₁₂ (分子量 1,350)

2-4-3. 水溶性エラスチンのアミノ酸組成

Table 6 に動物組織より精製した水溶性エラスチンのアミノ酸組成 (モル相対比%) を示した。ブタ大動脈由来とマグロ動脈球由来水溶性エラスチンを比較すると、それぞれを構成しているアミノ酸に大きな違いが見られた。特に、Gly、Ala、Val、Pro をはじめとする疎水性アミノ酸、またエラスチンに特有である架橋アミノ酸の Des、Ide においてマグロ動脈由来は低い値であった。

Table 7、8 にそれぞれ異なる脱塩方法により得られたブタ大動脈由来およびマグロ動脈球水溶性エラスチンのアミノ酸組成を示した。これらの結果から、異なる脱塩方法による大きなアミノ酸組成の変化は見られなかった。しかしながら、Des、Ide の値に着目するとブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいて透析と Sep-Pak® では、僅かな変化が見られた。

Table 6. 動物組織由来水溶性エラスチンのアミノ酸組成の比較（モル相対比%）

成分名	ブタ大動脈由来	マグロ動脈球由来
Asp+Asn	1.7	4.9
Thr	0.4	3.5
Ser	0.5	3.6
Glu+Gln	4.2	7.3
Gly	21.7	22.7
Ala	19.7	10.8
Val	10.3	7.7
Met	0.2	0.4
Ile	2.4	3.1
Leu	8.1	5.4
Tyr	2.0	3.1
Phe	4.6	3.5
Lys	1.5	2.6
His	0.2	1.0
Arg	0.4	3.6
Hyp	1.9	1.6
Pro	19.4	15.2
Des	0.33	0.02
Ide	0.35	0.06
Des+Ide	0.68	0.08
Gly+Ala+Val+Pro	71.2	56.4
Asp+Glu	5.9	12.2
Lys+His+Arg	2.1	7.2

Table 7. 脱塩方法が異なるブタ大動脈由来水溶性エラスチンのアミノ酸組成の比較
(モル相対比%)

成分名	透析	Sep-Pak [®]
Asp+Asn	1.0	0.9
Thr	0.2	0.2
Ser	0.3	0.3
Glu+Gln	2.7	2.3
Gly	30.8	31.9
Ala	25.4	21.9
Val	13.5	14.0
Met	0.1	0.1
Ile	1.5	2.2
Leu	5.7	6.2
Tyr	1.4	1.4
Phe	3.1	3.9
Lys	0.9	1.2
His	0.1	0.1
Arg	0.2	0.2
Hyp	1.2	1.3
Pro	11.5	11.7
Des	0.25	0.20
Ide	0.22	0.18
Des+Ide	0.48	0.33
Gly+Ala+Val+Pro	81.1	79.4
Asp+Glu	3.7	3.2
Lys+His+Arg	1.2	1.6

Table 8. 脱塩方法が異なるマグロ動脈球由来水溶性エラスチンのアミノ酸組成の比較
(モル相対比%)

成分名	透析	Sep-Pak [®]
Asp+Asn	3.1	3.1
Thr	4.2	3.9
Ser	2.1	2.0
Glu+Gln	4.4	4.6
Gly	41.1	40.9
Ala	8.7	9.0
Val	7.2	7.2
Met	0.3	0.7
Ile	2.6	2.4
Leu	4.5	4.3
Tyr	3.5	3.8
Phe	2.9	2.7
Lys	2.3	2.0
His	0.6	0.5
Arg	2.1	2.0
Hyp	0.6	0.7
Pro	10.0	10.2
Des	0.01	0.02
Ide	0.04	0.06
Des+Ide	0.05	0.08
Gly+Ala+Val+Pro	67.0	67.3
Asp+Glu	7.6	7.7
Lys+His+Arg	5.0	4.4

2-4-4. ブタ由来水溶性エラスチンの分画における収量・収率および分子量分布

コアセルベーション法によって、ファームエラスチン®を分画したところ、上清として得られた画分 1 は 89.3%、沈殿として得られた画分は 10.0%の収率で得られた (Table 9)。

ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析では、それぞれの画分の分子量は約 1,350 から 670,000 に渡り幅広く分布した (Fig. 12)。分画前のファームエラスチン®と画分 1 におけるクロマト波形は類似しており、今回使用したファームエラスチン®は比較的低分子が多く存在した。画分 1、2 は、それぞれ分子量 1,000 から 44,000、2,000 から 670,000 に分布した。この結果から、コアセルベーション法により簡易的に低分子と高分子を分画することが可能であることが分かった。

Table 9. コアセルベーション法によって得られた画分の収量・収率

画分	ファームエラスチン® (g)	収量 (g)	収率 (%) *
1	24	20.0	83.3
2		2.4	10.0

*収率は、使用した重量に対する収量の割合を算出した。

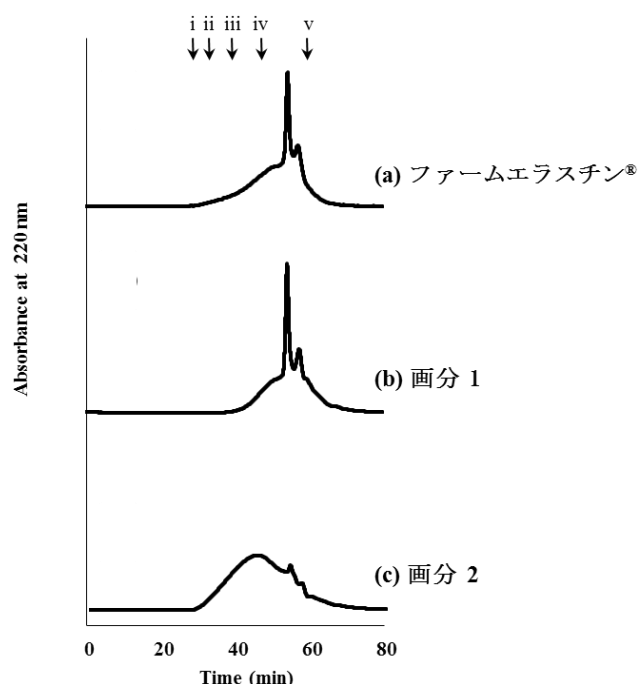


Fig. 12. コアセルベーション法によって得られた画分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布

標準試料: (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビタミン B₁₂ (分子量 1,350)

2-4-5. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価

異なる脱塩方法により得られたブタ大動脈由来水溶性エラスチンの濁度測定結果を Fig. 13 に示した。脱塩方法が透析では濃度 2.0 mg/mL で 20℃付近から吸光度が上昇した (Fig. 13 (a))。すなわち、コアセルベーションを開始した。一方、Sep-Pak®では濃度 30 mg/mL でもコアセルベーションを示さなかった (Fig. 13 (b))。この結果から、透析により脱塩した試料はコアセルベーション能を有するということが分かった。

異なる脱塩方法により得られたマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの濁度測定結果を Fig. 14 に示した。マグロ動脈球由来水溶性エラスチンについては、異なる脱塩法であっても濃度 2.0 mg/mL において緩やかな濁度曲線を示し、コアセルベーション能を有した。しかしながら、マグロ動脈球由来水溶性エラスチン（凍結乾燥後の粉末）はやや黒色を帯びており、そのため濃度 10 mg/mL における開始時の吸光度がブタ大動脈由来水溶性エラスチンよりも高い値であった。

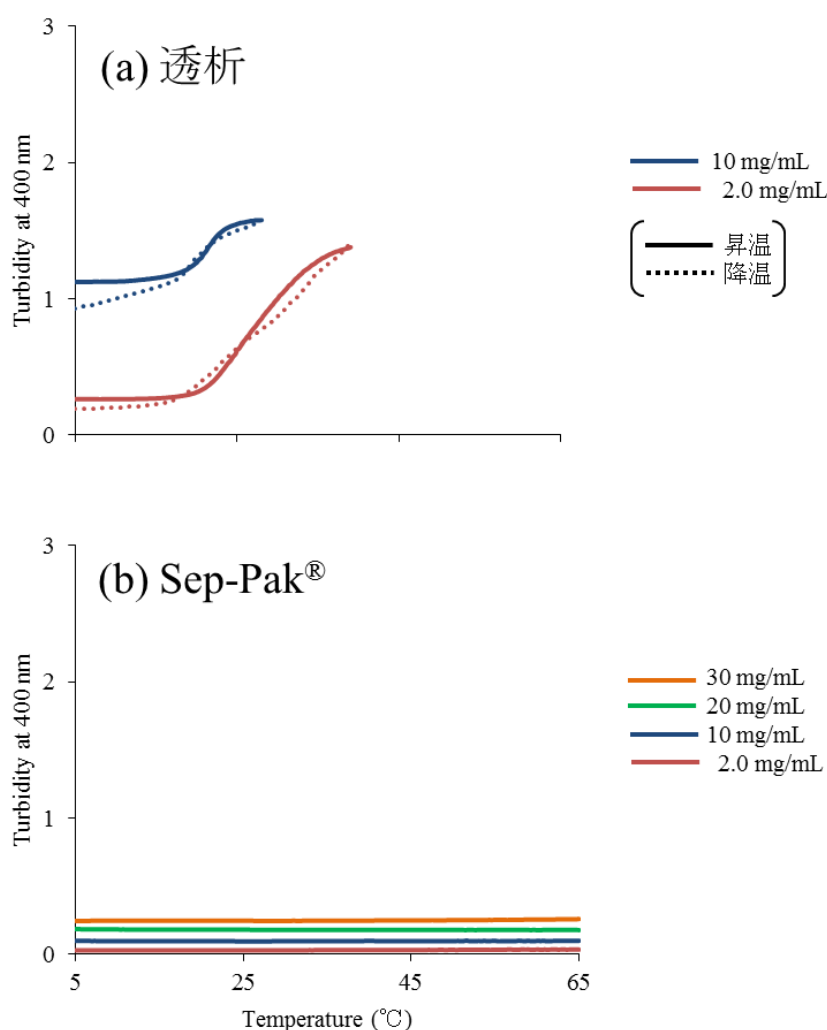


Fig. 13. 異なる脱塩方法で精製したブタ大動脈由来水溶性エラスチンのコアセルベーション

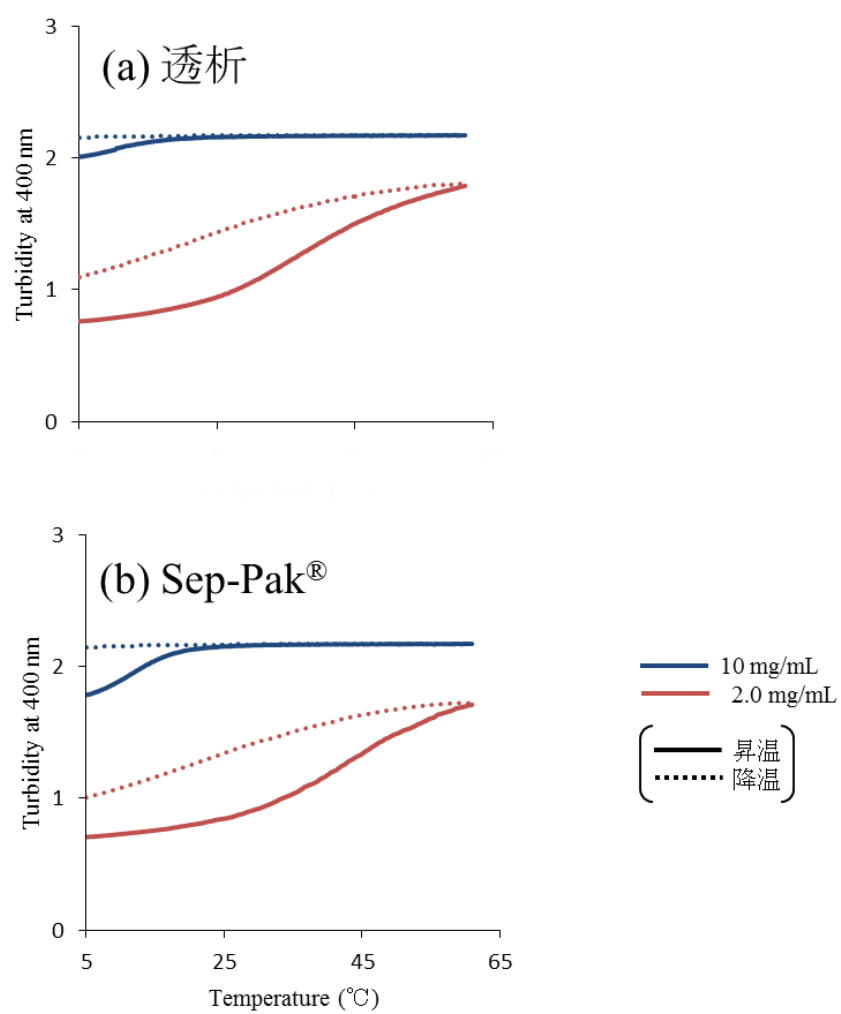


Fig. 14. 異なる脱塩方法で精製したマグロ動脈球由来水溶性エラスチンのコアセルベーション

2-4-6. ヒト3次元培養表皮に対する保湿性の評価

ファームエラスチン®とその画分1、2におけるヒト3次元培養表皮に対する皮膚内含水率について、Table 10 にまとめた。

Fig. 15 より、3次元培養皮膚における皮膚内含水率はファームエラスチン®とその画分1、2の添加濃度0、0.02、0.1、1.0% (w/w) に対して、濃度依存的に向上する傾向が見られた。

Fig. 15 (a) より、ファームエラスチン®は濃度0.1、1.0% (w/w) において0% (w/w) との間で有意差が確認された ($P < 0.05$)。しかしながら、8.0% (w/w) と濃度を増大させた場合、皮膚内含水率は減少した。(b) より、ファームエラスチン®の画分1は、全ての濃度において0% (w/w) との間で有意差が確認された ($P < 0.05$)。(c) より、ファームエラスチン®の画分2は、1.0% (w/w) において0% (w/w) との間で有意差が確認された ($P < 0.05$)。画分1 (b) における1.0% (w/w) は、0% (w/w) と比較して約27.8%も皮膚内含水率が向上した。

Table 10. ファームエラスチン®および画分の皮膚内含水率

No.	試料	濃度 (% (w/w))	皮膚内含水率 (%)	データ数 (n)
A	ファームエラスチン®	D.W.	49.40 ± 10.13 [‡]	30
		0	37.39 ± 14.78 [‡]	3
		0.1	58.44 ± 5.75 [‡]	12
		1.0	65.68 ± 8.86 [‡]	12
		8.0	52.42 ± 4.89 [‡]	9
B	画分1 (低分子)	0.02	59.47 ± 4.93 [‡]	12
		0.1	65.42 ± 5.75 [‡]	12
		1.0	77.20 ± 7.75 [‡]	12
C	画分2 (高分子)	0.02	52.50 ± 8.22 [‡]	6
		0.1	55.90 ± 6.81 [‡]	6
		1.0	66.57 ± 8.09 [‡]	6

‡標準偏差

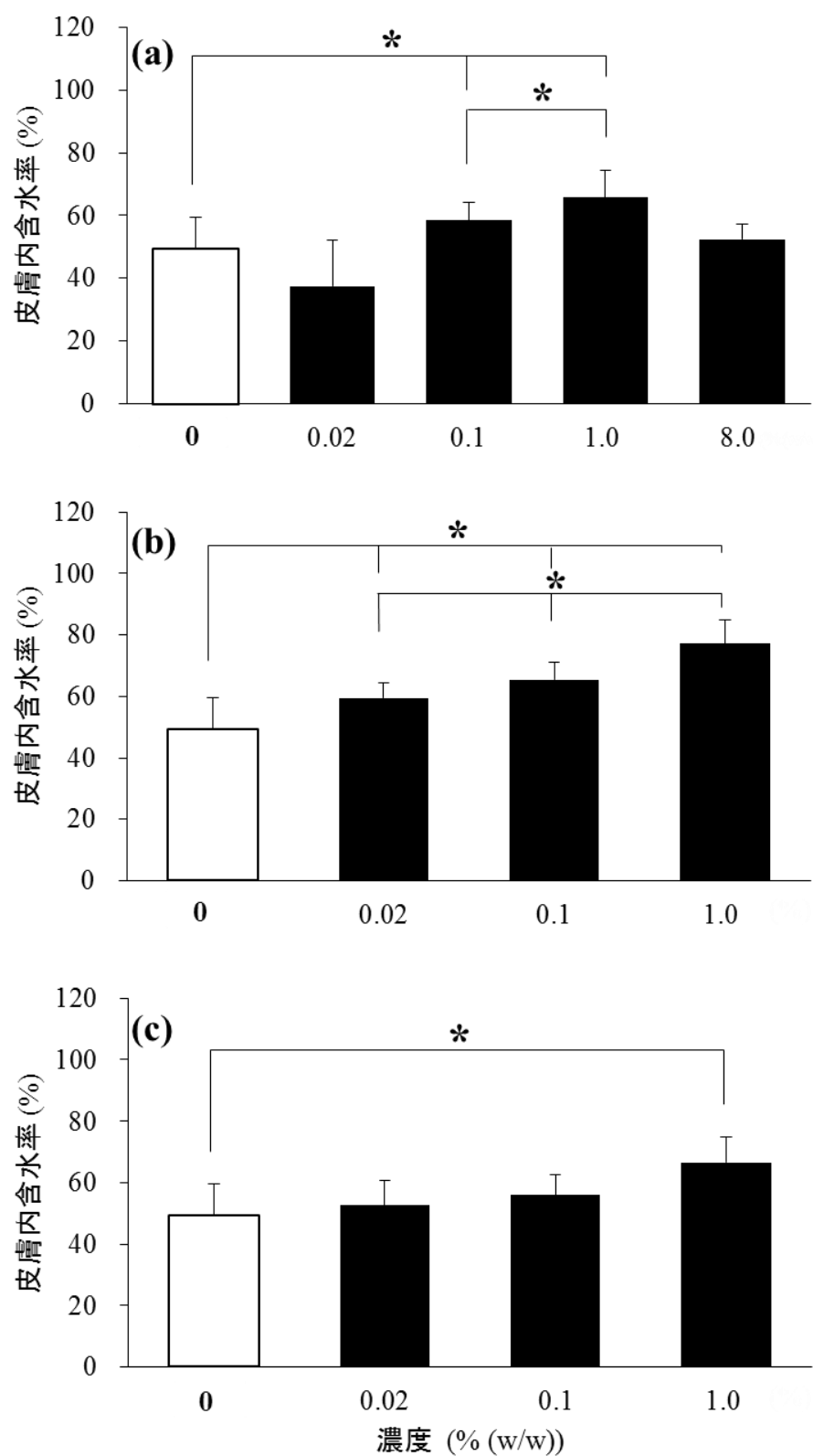


Fig. 15. ファームエラスチン®および分画後の皮膚内含水率の比較
 (a) ファームエラスチン、(b) 画分 1、(c) 画分 2

* $P < 0.05$ において有意差あり

2-4-7. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性の評価

動物組織から精製した水溶性エラスチンのマッシュルーム由来チロシナーゼの阻害率を、Table 11 に示した。ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンは、濃度依存的にチロシナーゼの活性を阻害した。また、それぞれ濃度 10、20 mg/mL の間で有意差が確認された ($P < 0.05$ 、Fig. 16)。工場レベルで製造されたファームエラスチン® (E&C 社製) は、本実験において精製したブタ大動脈由来水溶性エラスチンと比較してマッシュルーム由来チロシナーゼに対する高い阻害率を示した。また、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンと比較して、ファームエラスチン®の方がより強い阻害率を示した。

Table 11. 動物組織から精製した水溶性エラスチンのチロシナーゼ阻害率

水溶性エラスチン	濃度 (mg/mL)	阻害率 (%)	データ数 (n)
ブタ大動脈由来	10	$0.80 \pm 1.74^{\ddagger}$	9
	20	$3.97 \pm 2.67^{\ddagger}$	9
マグロ動脈球由来	10	$5.09 \pm 3.82^{\ddagger}$	9
	20	$7.75 \pm 5.24^{\ddagger}$	9
ファームエラスチン®	1.0	$5.23 \pm 1.81^{\ddagger}$	15
	10	$14.70 \pm 2.08^{\ddagger}$	15

\ddagger 標準偏差

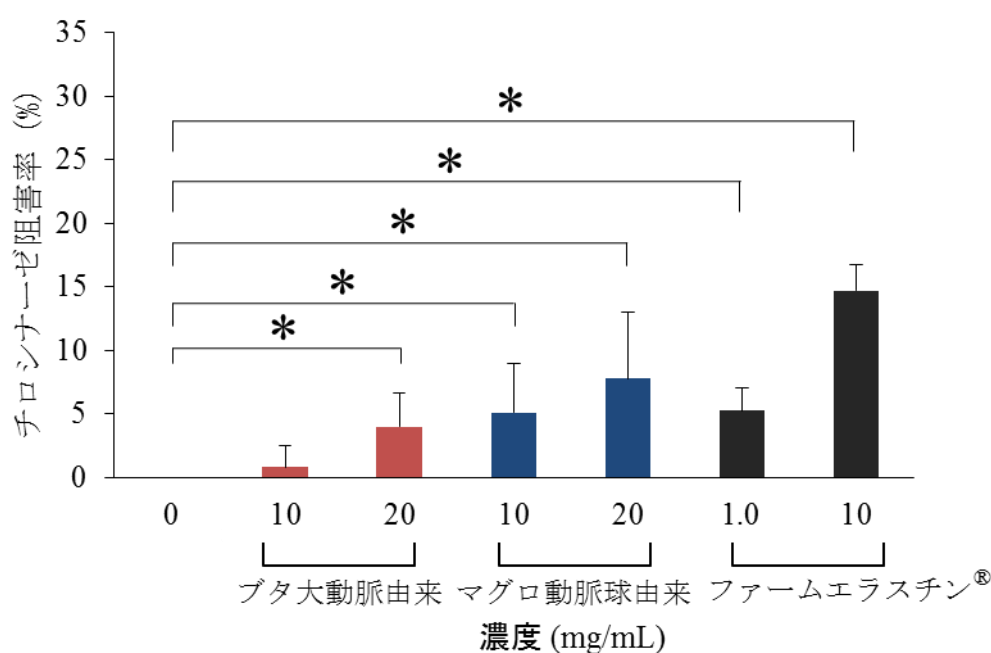


Fig. 16. 動物組織から精製した水溶性エラスチンのチロシナーゼ阻害率の比較

2-4-8. γ 線照射によるナノ粒子化

2-4-8-1. γ 線照射に用いる試料のコアセルベーション能

透析処理後の E&C 社製マグロ動脈球由来水溶性エラスチンの濁度測定結果を Fig. 17 に示した。この試料についても、Fig.14 と同様にやや黒色を帯びていた。脱塩方法については、工場生産のため、当研究室で行っている方法とは異なる。そのため当研究室において、透析を 1 週間行ったところ、濃度 10 mg/mL で 15°C 付近からコアセルベーションを開始し、コアセルベーション能を有した (Fig. 17)。

ブタ大動脈由来水溶性エラスチンと E&C 社製ブタ真皮由来コラーゲンの混合物における混合比、および濃度が異なる濁度測定結果を Fig. 18 に示した。コラーゲンは、コアセルベーション能を有さないが、エラスチンと混合することでコアセルベーション能を示した。また、混合比が 1:1 (Fig. 18 (a)) と 1:50 (Fig. 18 (d)) を比較すると、エラスチンの含有量が減少する程、コアセルベーション開始温度が高温側にシフトすることが確認できた。これは、コアセルベーション能が弱くなっていることを示し、同時に混合物中のエラスチンが作用しコアセルベーションを示したと示唆している。

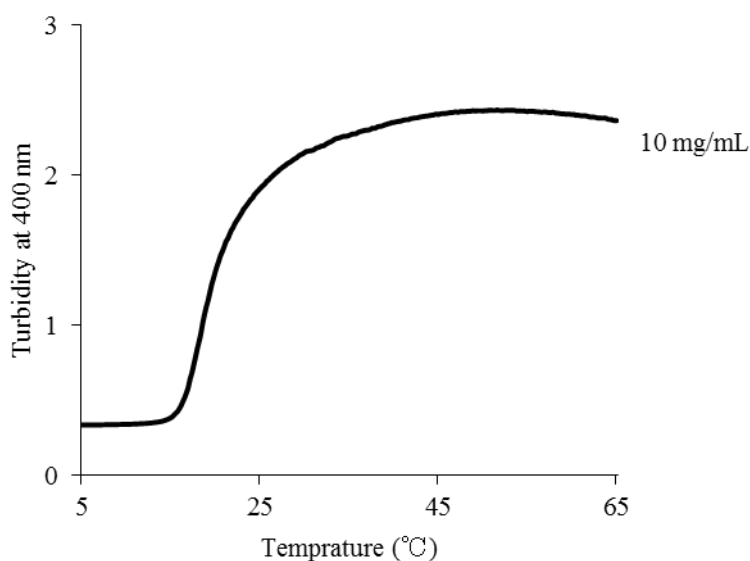


Fig. 17. マグロ動脈球由来水溶性エラスチン (透析処理) のコアセルベーション

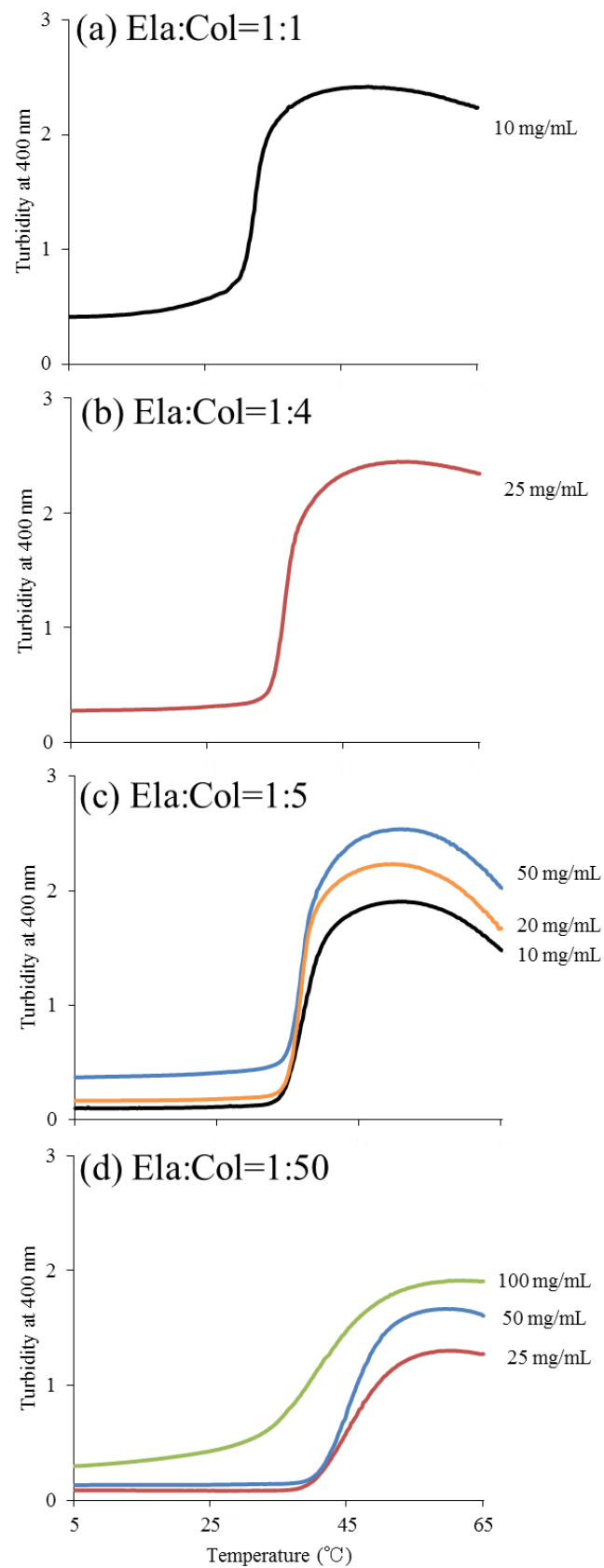


Fig. 18. ブタ大動脈由来水溶性エラスチンとコラーゲン混合物のコアセルベーション

2-4-8-2. 粒子径のサイズ

Table 12 に、E&C 社製マグロ動脈球由来水溶性エラスチンに対する γ 線照射後の粒子径を示した。粒子径は 372.4 ± 78.6 nm が 97.9% を占めた。しかしながら、4 - 5 μ m、5 μ m 以上の粒子径も存在した。

ブタ大動脈由来水溶性エラスチンと E&C 社製ブタ真皮由来コラーゲンの混合物について、5°C と Fig. 18 よりそれぞれの混合比において安定したコアセルベーションを示した温度である 40°C あるいは 60°C における粒子径の測定結果を Table 13-A に示した。測定温度について 5°C と 40°C あるいは 60°C において比較すると、混合比 1:1、1:50 では粒子径がそれぞれ 40°C あるいは 60°C の方が大きく、5°C の方が小さい傾向が見られた。混合比が 1:4、1:5 では逆の傾向が見られた。

Table 13-B に、Table 13-A の γ 線照射後の粒子径の測定結果を示した。試料は γ 線照射後でも液体の状態であった。 γ 線照射後の混合物における粒子径は、全てにおいて測定温度が 5°C の方が小さく、60°C において大きい傾向が見られた。

Table 12. マグロ動脈球由来水溶性エラスチンの γ 線照射後の粒子径分布

濃度 (mg/mL)	粒子径 (nm)	存在比 (%)
10	41.7 ± 8.3	2.1
	372.4 ± 78.6	97.9

Table 13-A. ブタ大動脈由来水溶性エラスチンとコラーゲン混合物の
異なる温度における粒子径分布 (粒子径 (nm) /存在比 (%))

混合比 (濃度)	測定温度 (°C)		
	5	40	60
1:1 (10 mg/mL)	20.4 ± 2.7 / 2.7	58.8 ± 7.1 / 2.3	—
	93.4 ± 17.2 / 23.5	428.5 ± 71.6 / 97.7	—
	613.4 ± 112.4 / 73.8		—
1:4 (25 mg/mL)	11.6 ± 1.1 / 7.3	31.0 ± 5.0 / 05.3	—
	207.5 ± 40.4 / 92.7	544.7 ± 104.3 / 94.7	—
1:5 (10 mg/mL)	11.6 ± 1.2 / 9.4	365.1 ± 62.7 / 50.7	—
	283.2 ± 50.8 / 90.6	8186.4 ± 1079.0 / 49.3	—
1:5 (25 mg/mL)	11.6 ± 1.3 / 16.1	391.5 ± 66.9 / 51.2	—
	210.8 ± 42.0 / 83.9	1289.5 ± 227.2 / 48.8	—
1:50 (25 mg/mL)	40.4 ± 6.0 / 35.1	—	57.7 ± 7.5 / 2.0
	2186.7 ± 521.3 / 64.9	—	454.4 ± 89.5 / 98.0

Table 13-B. ブタ大動脈由来水溶性エラスチンとコラーゲン混合物の
異なる温度における γ 線照射後の粒子径分布 (粒子径 (nm) /存在比 (%))

混合比 (濃度)	測定温度 (°C)		
	5	40	60
1:1 (10 mg/mL)	115.0 ± 15.3 / 25.8	1004.4 ± 171.0 / 24.5	—
	3735.2 ± 653.2 / 74.2	8747.0 ± 1148.3 / 75.5	—
1:4 (25 mg/mL)	12.0 ± 1.6 / 100.0	1797.5 ± 375.9 / 29.0	—
		8674.6 ± 1171.6 / 71.0	—
1:5 (10 mg/mL)	12.0 ± 1.6 / 39.6	1791.6 ± 381.5 / 100.0	—
	129.8 ± 14.5 / 60.4		—
1:5 (25 mg/mL)	12.1 ± 1.5 / 29.4	10.5 ± 1.5 / 98.9	—
	48.5 ± 8.5 / 70.6	2672.7 ± 363.0 / 1.1	—
1:50 (25 mg/mL)	809.3 ± 136.1 / 100.0	—	1110.3 ± 125.5 / 10.1
		—	2903.5 ± 613.2 / 89.9

2-5. Discussion

ブタ大動脈組織あるいはマグロ動脈球組織から精製された水溶性エラスチンは、精製に使用した組織量に対して、約 10 - 20%の収率で得られた。生体内におけるエラスチンの含有量は、組織や生物種によって異なっていることが示唆された。本研究において用いたブタ大動脈組織とマグロ動脈球組織は、生物種も部位も異なるため、水溶性エラスチンとして精製される収量・収率において、大きな差異が見られると考えられた。Table 3 において、ブタ大動脈由来の方がマグロ動脈球よりも収量・収率が高かった。しかしながら、Table 4、5 において同様の方法で精製した場合においても水溶性エラスチンの収率は、ブタ大動脈由来水溶性エラスチンでは、18%、10%、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいても、8.6%、15.1%と精製物の収率に差が生じた。当研究室における過去の検討においても、おおよそ 10 - 20%程度の収率であり、水溶性エラスチンの精製方法は技術的に容易ではないということが明らかとなった。そこで、水溶性エラスチン精製における簡便化を目指し、アルカリ性の可溶化液を中和することで発生する中和塩の除去について着目した。これまでは、透析膜を用いた透析を一週間程行ってきたが、試料の損失が最も懸念される操作であると同時に、時間と労力も必要であった。新たな脱塩法として、オクタデシルシリル基 (C18) が充填された固相カラムである Sep-Pak[®] について検討を行った。操作は、非常に簡便であり、脱塩に必要な時間は数時間程度と透析と比較して極めて時間の短縮が可能となった。この方法において精製された水溶性エラスチンの収量・収率は、ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来において向上した。

動物組織由来水溶性エラスチンの分子量は、約 1,350 から 670,000 にかけて幅広い分布であった。ブタ大動脈由来とマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの分子量を比較すると、ブタ大動脈由来の方が比較的高分子の含有率が高かった (Fig. 9-11)。しかしながら、同様の方法で作製したにもかかわらず分子量の分布は変化した。分子量の変化からも、全く同一の水溶性エラスチンの精製は容易ではないことがいえる。脱塩方法によって収量・収率は変化した。分子量の分布も同様に変化した。脱塩方法が透析において、含まれている分子量の分布の割合は比較的高分子が高く、Sep-Pak[®] においてはその高分子が取り除かれ低分子量の分布の割合が高くなった (Fig. 10、11)。これは、脱塩方法の操作原理の違いによるものであると考える。透析は、用いる透析膜の孔のサイズ以下の成分を排除する。それに対して、Sep-Pak[®] は充填されているオクタデシルシリル基 (C18) に対して試料を吸着させ、溶出液の疎水度の割合によって、目的物を溶出させる。このことから Sep-Pak[®] は操作において、少なからず試料の吸着が起こっていると考えられる。そして、分子量分布の結果から、高分子が吸着されている可能性があるということが示唆された。

水溶性エラスチンにおける一つの指標は、エラスチンにのみ特有に存在する架橋アミノ酸である Des、Ide の含有量である。日本健康・栄養食品協会より 2012 年に発行され

た「認定健康食品（JHFA）解説書：エラスチン食品」において、水溶性エラスチンの指標が定義されている。Des、Ide の含有量は、モル相対比において哺乳類由来で 0.2%、魚由来では 0.04%、重量比に換算するとそれぞれ 1.0%、0.2%である [29]。Table 6 - 8 において、上記した条件以上に Des、Ide の含有量が多く含まれており、本研究では高純度で動物組織より水溶性エラスチンを精製することができたといえる。また、ブタ大動脈およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンのアミノ酸組成は、異なる傾向が見られた。JHFA の示しているように Des、Ide の含有量については、ブタ大動脈由来水溶性エラスチンにおいて高い含有量であった。一方、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンはブタ大動脈由来よりも、Asp、Thr、Ser、Tyr、Lys、Arg の含有量が高い傾向にあり、親水性アミノ酸が多く含まれていた。異なる脱塩方法により、精製された動物組織由来水溶性エラスチンのアミノ酸組成において、各アミノ酸量に大きな変化は見られなかった。このことから、脱塩方法の違いによりエラスチンを構成するアミノ酸組成は変化しないことが明らかになった。

上述したとおり、水溶性エラスチンの分子量は、単一なものではなく幅広く分布しており、低分子、高分子に分画可能であるかを検討した。エラスチンに特有な性質であるコアセルベーションは、高温下で静置しておくで 2 層に分離しコアセルベート層を形成し、その部分には高分子が集合している [57]。この性質を利用し、本研究では簡便にコアセルベーション法によって分子量の異なる 2 つの画分に分画した。また、以降の実験においても使用ができるよう量的確保と市販されている水溶性エラスチンに関する知見を得る目的で、工業的に製造されたブタ大動脈由来水溶性エラスチンであるファームエラスチン®を使用した。ファームエラスチン®は、当研究室において精製したブタ大動脈由来水溶性エラスチンと同様に分子量約 1,350 から 670,000 にかけて幅広く分布したが、特に 44,000 以下の分布が多かった (Fig. 12)。コアセルベーション法によって得られた画分 1、2 は、分子量 1,000 から 44,000、2,000 から 670,000 に分画され、これらの収率を見ると画分 1 が約 90%を占め、ファームエラスチン®は、主に分子量 1,000 から 44,000 で構成されていた。この結果から、コアセルベーション法による分画が可能であった。

濁度測定では、ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいて異なるコアセルベーションを示した。まず、ブタ大動脈由来はマグロ動脈球由来水溶性エラスチンよりもわずかに低温側でコアセルベーションを開始し、直線的な濁度の変化を示した。また、温度降下に伴った測定における結果は可逆的な濁度曲線を示し、測定開始温度に戻った地点における吸光度の値は、ほぼ同様の値となった (Fig 13 (a))。一方、マグロ動脈球由来では、コアセルベーション能を有したものの緩やかな濁度曲線を示し、温度降下に伴って吸光度の値も減少し可逆的な性質を示したものの、測定開始温度に戻った地点における吸光度の値が、測定開始時よりも高い値であった (Fig. 14 (b))。コアセルベーション能は、エラスチンの分子内・分子間の疎水性相互作用に起因している

と報告されている [39、57]。アミノ酸分析の結果から、マグロ動脈球由来はブタ大動脈由来水溶性エラスチンに比べ、親水性アミノ酸の含有量が多かったということが、この結果に起因したと考える。一方、ブタ大動脈由来水溶性エラスチンにおいて異なる脱塩方法で処理した場合、アミノ酸組成に大きな変化は見られなかったにもかかわらず (Table 7)、コアセルベーション測定の結果は大きく異なった (Fig. 13)。エラスチン様ペプチドの研究では、アミノ酸残基数の長さ・繰り返し回数によってコアセルベーション能が変化するという報告がある [41]。すなわちコアセルベーション能は、分子量にも影響されうる。脱塩方法が透析と Sep-Pak® で得られた精製物は、分子量分布が異なったため、コアセルベーション能が変化したと考える。Sep-Pak® で脱塩したブタ大動脈由来水溶性エラスチンは低分子の成分が多かったため、コアセルベーション能を示さなかったと考えられる。

水溶性エラスチンの応用として、基礎化粧品素材として重要である保湿性と美白効果に着目し、検討を行った。実際に、実用化を目指し工業的に製造されている動物組織由来水溶性エラスチンであるブタ大動脈由来水溶性エラスチンのファームエラスチン® (株E&C 社製) を使用した。まず、ファームエラスチン® について保湿効果の確認を行う前に、本実験で使用したファームエラスチン® には塩が多く含まれていたため、皮膚上でエラスチンの効果のみを評価する目的で前処理として Sep-pak® を使用し、当研究室において再び脱塩の操作を行った。試験対象として、ヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト 3 次元培養表皮モデルである LabCyte EPI-MODEL 12 (LabCyte) を用いた。LabCyte の表面上に対してエラスチン水溶液を添加し、タンパク質が変性しない程度の温度で人為的に乾燥させた後、表皮にどのくらいの水分が留まっているかを測定し、皮膚内含水率とした。Table 10 より、ファームエラスチン® は、表皮に水分を留めておく作用を有した。その作用は濃度依存的に増加したため、添加したファームエラスチン® 水溶液中のエラスチンの質量が影響しているのではないかと考えられたが、添加濃度を 8.0% (w/w) まで増大させたところ、皮膚内含水率は反って低下した。この結果から、適切な濃度を添加することで皮膚内含水率を保持することが可能であると示唆された。画分 1、2 についても同様の傾向が見られ、特に画分 1 については、どの濃度においても 0% (w/w) との間に有意な差が確認され、濃度 1.0% (w/w) において 77.2% であった。

水溶性エラスチンに多く含まれる Gly、Ala、Pro は、皮膚の水分量の維持や向上に寄与しており、健康的な皮膚の状態を維持するという報告がある [58-60]。アミノ酸分析から、水溶性エラスチン中にはこれらのアミノ酸が多く含まれており、皮膚内含水率の向上に寄与したのではないかと考える。一般的に、角質層は分子量 500 以上のものを透過・吸収することができないと言われている [61]。しかしながら、保湿効果を有すると言われるヒアルロン酸の研究において、分子量が 400,000 であるにもかかわらず表皮、真皮を透過するといった報告がある [62]。この報告から、今回使用したファームエラスチン® の画分 1 において特に皮膚内含水率の向上が見られたのは、画分 1 がファームエラスチン® や画分 2 と比較して低分子量の分布が高かったため、表皮を透過し保

湿効果が向上したのではないかと考える。また、保湿効果を有すると知られているヒアルロン酸を経口摂取した場合、皮膚の水分量は3週間で約10%向上したという報告があり、この結果と比較してもエラスチンの保湿効果は十分に期待できるものである[63]。

美白効果を考えたとき、メラニンの合成を効果的に抑えることが広く研究されている[64-66]。メラニンは、皮膚の色や色素沈着に大きく関与している[67]。ヒトでは、メラニンは主にメラニン細胞で形成され、ジヒドロキシインドール前駆体の重合により形成される黒色、褐色のユーメラニンとシステイン抱合前駆体の重合が伴うことによって着色する赤色、黄色のフェオメラニンの2種類に分類される[68]。

メラニンの合成は、ユーメラニンおよびフェオメラニンの各々の形成に共通の初期及び律速反応（チロシンのL-DOPAへの水酸化及びL-DOPAのDOPAキノンへの酸化）に関与するチロシナーゼにより主に調整されている[69]。Table 11から、チロシナーゼ阻害率はエラスチンの濃度依存的に抑制されており、エラスチンがメラニン合成反応を穏やかに抑制することが明らかとなった。本実験においては、前項の実験で使用した工業的に製造された水溶性エラスチンに加え、「2-3-1」で精製したブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンも阻害剤として使用した。Fig. 16より、「2-3-1」で精製した水溶性エラスチンは、ブタ大動脈由来の濃度10 mg/mLを除き、濃度0 mg/mLとの間で有意差が確認された ($P < 0.005$)。また、ブタ大動脈由来よりもマグロ動脈球由来水溶性エラスチンの方が、チロシナーゼ阻害率が高い傾向が見られた。これは、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいてTyrの含有量が多かったことに起因すると考える。チロシナーゼは、生体内においてTyrに作用し、メラニンを生産していく。そのため、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンではブタ由来水溶性エラスチンと比較し競合阻害が強く働いたのではないかと推測する。

次に、バイオマテリアルとしての応用を考え γ 線照射による分子間架橋を行い、安定した粒子の作製を行い、DDS担体の作製に対する基礎検討を行った。エラスチンのような有機高分子は、 γ 線照射によってポリペプチドの切断と架橋を引き起こすと報告されている[70、71]。当研究室では、これまでブタ大動脈由来、またはカツオ由来水溶性エラスチンにおいて同様の検討が行われ、それらの有用性が示された[53]。そのため、本実験においては新たな素材検討として、マグロ動脈球由来水溶性エラスチンおよびブタ大動脈由来水溶性エラスチンとコラーゲンの混合物について、検討を行った。ヒトの皮膚にはエラスチンが1 - 5%、コラーゲンが70 - 80%の割合で存在し、その比率は約1:50であると言われている[64]。そこで、まずその混合比を模してエラスチンとコラーゲンの混合物を調製したところ、コアセルベーション能を示したことは驚くべき結果であった (Fig. 18)。そして、混合比を1:1、1:4、1:5と変化させても同様にコアセルベーション能を示した。混合比が1:1と1:50では含まれるエラスチン量は異なり、各々の濁度測定結果を比較すると、エラスチン量の多い1:1においてコアセルベーション開始温度が低温側であり、直線的に濁度の値が変化した (Fig. 18 (a)、(b))。コアセルベ

ーション能におけるコラーゲンの影響を確認するため、混合比 1:1 (濃度 10 mg/mL) におけるエラスチン量をそのままコラーゲン量を 5 倍にした混合比 1:4 (濃度 25mg/mL) において測定を行った。その結果、一見大きな変化が見られないが、わずかにコアセルベーション開始温度が高温側にシフトしており、エラスチンとコラーゲン混合物におけるコアセルベーション能は、エラスチンに起因していることが分かった。混合比 1:5 において、濃度を 10、20、50 mg/mL で測定したところ、コアセルベーション開始温度に大きな変化が見られなかったが、コアセルベーションを示した地点での吸光度の値が向上した (Fig. 18 (c))。これらのことから、コラーゲンはエラスチンのコアセルベーション能を大きく阻害することはないが、吸光度の値を向上させる効果があることが示唆された。また、通常コラーゲンは熱を加えることでゲルを形成するが、加熱後のエラスチンとコラーゲンの混合物は溶液状態のままであった。

マグロ動脈球由来水溶性エラスチンの場合、 γ 線を照射することで、約 400 nm の粒子が形成され大半を占めた。 γ 線照射後の溶液で沈殿などが見られず、冷却してもゲル化することがなく、安定した粒子を得ることができたといえる。また、架橋前のものについても温度変化による粒子径の値を測定し架橋前後の結果を比較することで、架橋によりどのような現象が起きているかを、さらに詳細に推測することが可能であると考えた。そのため、ブタ大動脈由来水溶性エラスチンとブタ真皮由来コラーゲンの混合物においては、上述した測定を行った。一般的に、コラーゲンに対する γ 線照射は、コラーゲンの物理学的特性を向上させる。つまり、ゲル化やハイドロゲル化の作製のため目的で行われる。コラーゲンは、 γ 線照射によって水の電離で生じたヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) などによる間接的作用が働き、コラーゲン分子の架橋が起こる。ヒドロキシラジカルなどがタンパク質中のアミノ酸 (特に含硫アミノ酸や芳香族アミノ酸) に作用すると不対電子をもつ高分子ラジカル (マクロラジカル) となり、その分子間反応により架橋が起こっていると考えられている [72]。そこで、エラスチンと混合することでどのような変化が生じるかを検討した。使用したエラスチンとコラーゲンの混合比、濃度、分子が集合している状態、つまりコアセルベーションを示している温度については、前項で得られた濁度測定の結果をもとにした。まず γ 線照射エラスチンとコラーゲンの混合物の粒子径について、混合比が 1:1、1:50 では、温度が 5°C の時よりもコアセルベーションを示す温度において粒子径が比較的小さくなっており、分子が寄り集まり小さな集合体を形成していることが推測された。一方、1:4、1:5 では、前述した事象とは逆に、コアセルベーションを示す温度において大きな粒子径の分布が多くなっており、前者の混合比と比較すると大きな分子の集合体を形成していることが推測された (Table 13-A)。これらのエラスチンとコラーゲンの混合物に対して γ 線照射することで、ゲル、ハイドロゲルを形成することはなかったが、コアセルベーションを示す温度において γ 線照射前よりも大きな粒子径が測定された (Table 13-A)。特に 1:1、1:50 では測定温度が 5°C において、他の混合比と比べても大きな粒子径が分布していた。本実験で

は、エラスチンとコラーゲンの混合物において、完全に安定した粒子を得ることはできなかったが、エラスチンとコラーゲンを混合することでゲルやハイドロゲルではなく、液体状の溶液を作製することができるが見出された。今後、混合比や濃度、または γ 線の照射量などを検討することで安定した粒子の形成が可能となるだろう。エラスチンの有機高分子への γ 線照射は、ポリペプチドの切断と架橋を引き起こすことが報告されている [70]。従って、溶液状態において γ 線照射することで H_2O が分解され、生じた $\text{OH}\cdot$ がエラスチン分子間に相互作用を引き起こしたと考えられる。しかし、エラスチン分子のどのアミノ酸が架橋に関与しているかという点については、未だ不明であり今後の研究課題となるだろう。また、 γ 線照射の安全性についてであるが、 ^{60}Co - γ 線照射は一般的に殺菌殺虫、発芽防止などを目的に農作物や食品に応用されている。国際連合食糧農業機関（FAO）や国際原子力機構（IEA）、世界保健機構（WHO）の食品照射合同専門家委員会は 1980 年に 10 kGy 以下の照射食品の安全宣言を行っており、また WHO は 1997 年にこの上限を撤廃し、30 - 50 kGy の照射を受けた食品についても安全宣言を行っている [73-76]。そのため、安全性における懸念は無いといえる。

第 3 章

動物組織からの有用成分の抽出とその応用

3-1. Introduction

第2章では、動物組織（ブタ大動脈、マグロ動脈球）より水溶性エラスチンを精製し、精製方法における脱塩の簡便化と精製物に対する品質改善を行った。得られた精製物についてエラスチンとしての基礎評価を行った結果、高純度な水溶性エラスチンが精製されたことが確認された。また、動物組織から精製された水溶性エラスチンの応用を考え、 γ 線照射によるエラスチン内の分子架橋を行った結果、安定した粒子の作製に成功した。そして、化粧品素材としての有用性の評価を評価するため保湿剤や美白剤などに使用できるかヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験とマッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行った。その結果、動物組織より精製された水溶性エラスチンは、化粧品素材として有用な素材であることが確認された。しかしながら、動物組織からのエラスチン精製には複雑な工程が必要であり、均質な試料を得ることが困難である。

そこで、第3章では、エラスチンを含有する新たな素材の簡便な抽出方法を検討し、水溶性エラスチンと同様に基礎的な評価を行った。さらにエラスチン以外の成分の同定としてヒアルロン酸、ラミニンについて定量を行った。ヒアルロン酸については、ブタ大動脈の内膜に6.4%、中膜に4.6%と合計11%含まれていると報告されている[77]。ラミニンは、基底膜を構成する高分子タンパク質でありコラーゲンなどの成分と結合し合い、その構造を形成している。そのため、本研究においてこれらの成分が保持されていると推測した。得られた抽出物について化粧品素材に対する応用として、ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行った。

3-2. Materials

「2-2. Materials」に記載した項目に加え、以下の試薬を使用した。

Hyaluronan Quantikine ELISA Kit

R&D Systems 社

Laminin (LN) EIA Kit

タカラバイオ株式会社

3-3. Methods

3-3-1. 動物組織からの有用成分の抽出

第2章では、動物組織より高純度な水溶性エラスチンを得るため、熱アルカリ処理の前に、動物組織より希アルカリ処理によってエラスチン以外の可溶性タンパク質の除去を行った。第3章では、この希アルカリ処理を行わず動物組織をそのまま熱アルカリ処理することにより、水溶性エラスチンを含んだ有用成分の抽出を行った。

3-3-1-1. ブタ大動脈組織からの有用成分の抽出

ブタ大動脈脱脂組織を高温乾燥機にて 100℃で 2 時間乾燥させ、粉碎機にて粉末状したものを使用した。ブタ大動脈脱脂組織 (40 g) に対して 16.7 倍容量の 0.2 M NaOH (334 mL) を加え 100℃で 120 分間攪拌した後、氷で急冷し酢酸を用いて中和 (pH 6.5) した。この操作の際に生成された中和塩を除去するために、透析膜 (Spectra/Por® 3,500 cut) 用いて脱塩を行った。

ブタ大動脈 (脱脂組織)

- ↓高温乾燥機にて乾燥 (100℃、2 時間)
- ↓粉碎機にて粉碎
- ↓試料の 16.7 倍量の 0.2 M NaOH を加え攪拌 (100℃、120 分間)
- ↓氷で急冷
- ↓酢酸を用いて中和 (pH 6.5)
- ↓透析膜 (Spectra/Pore® 3,500 cut) (4℃、4 日間)
- ↓凍結乾燥

ブタ大動脈由来水溶性エラスチン含有物

Fig. 19-A. ブタ大動脈組織からの有用成分の抽出スキーム

3-3-1-2. マグロ動脈球組織からの有用成分の抽出

マグロ動脈球組織を高温乾燥機にて 100℃で 2 時間乾燥させ、粉碎機にて粉末状にしたものを使用した。マグロ動脈球組織 (40 g) に対して 4 倍容量の 0.1 M NaOH (160 mL) を加え 100℃で 80 分間攪拌した後、氷で急冷し酢酸を用いて中和 (pH 6.5) した。この操作の際に生成された中和塩を除去するために、透析膜 (Spectra/Por® 3,500 cut) を用いて脱塩を行った。

マグロ動脈球組織

- ↓高温乾燥機にて乾燥 (100℃、2 時間)
- ↓粉碎機にて粉碎
- ↓試料の 4 倍量の 0.1 M NaOH を加え攪拌 (100℃、80 分間)
- ↓氷で急冷
- ↓酢酸を用いて中和 (pH 6.5)
- ↓透析膜 (Spectra/Pore® 3,500 cut) (4℃、4 日間)
- ↓凍結乾燥

マグロ動脈球由来水溶性エラスチン含有物

Fig. 19-B. マグロ動脈球からの有用成分の抽出スキーム

3-3-2. 有用成分の基礎評価

第 2 章と同様に動物組織から抽出した有用成分について、分子量の分布、アミノ酸組成、濁度測定によるコアセルベーション能における基礎評価を行った。そして、有用成分にヒアルロン酸、ラミニンが含まれるか定量を行った。

3-3-2-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布の確認

第 2 章「2-3-3-1」と同様の方法で行った。

3-3-2-2. アミノ酸組成の評価

第 2 章「2-3-3-2」と同様の方法で行った。

3-3-2-3. 濁度測定によるコアセルベーション能の評価

試料を濃度 2.0 mg/mL に D.W.で調製した。その後の操作は、第 2 章「2-3-3-3」と同様の方法で行った。

3-3-2-4. ヒアルロン酸定量

Calibrator Diluent RD5-18 を使用してブタ由来大動脈由来有用成分および水溶性エラスチンを濃度 5.0 mg/mL、マグロ動脈球由来有用成分および水溶性エラスチンを濃度 1.0 µg/mL に調製した。付属の 96 well プレートに、十分に攪拌した Assay Diluent RD1-14 を 50 µL 添加した。次いで、Hyaluronan standard、試料、コントロールとして Calibrator Diluent RD5-18 をそれぞれ 50 µL 添加後、2 時間振盪させた。その後、各 well の溶液を除去し、Wash Buffer 400 µL で 5 回洗浄した。Hyaluronan Conjugate を 100 µL 加え 2 時間振盪させた後、再度溶液を除去し Wash Buffer 400 µL で 5 回洗浄した。Substrate Solution を 100 µL 加え、遮光のもと 25°C で 30 分間置き、Stop Solution を 100 µL 加え十分に混合させた。マイクロプレートリーダー (ImmnoMini NJ-2300、バイオテック・ジャパン合同会社) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。濃度既知の Hyaluronan standard の吸光度より検量線を作成し試料のヒアルロン酸濃度を算出した。t 検定によって有意差を求めた。

3-3-2-5. ラミニン定量

Sample Diluent を使用して試料を濃度 10 mg/mL に調製した。予めラミニン γ 1 鎖 (旧 B2 鎖) を認識するモノクローナル抗体がコートされた付属の Antibody Coated Microtiterplate に対して、ラミニン標準液、試料、コントロールとして Sample Diluent をそれぞれ 100 µL ずつ添加し、25°C で 1 時間静置いた。その後、各 well の反応液を除去し、PBS (0.1% Tween[®] 20 含有) で 3 回洗浄した。Antibody-POD Conjugate を各ウェルに 100 µL 添加し、25°C で 1 時間静置いた。その後、各 well の反応液を除去し、PBS (0.1% Tween[®] 20 含有) で 4 回洗浄した。Substrate Solution (TMBZ) を各ウェルに 100 µL 添加し、25°C で 15 分間静置いた。その後、反応を停止させるため Stop Solution を各ウェルに 100 µL 添加し十分に混合した。そして、マイクロプレートリーダー (ImmnoMini NJ-2300、バイオテック・ジャパン合同会社) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。濃度既知のラミニン標準液の吸光度より検量線を作成し、試料のラミニン濃度を算出した。t 検定によって有意差を求めた。

3-3-3. 有用成分の応用検討

3-3-3-1. ヒト 3 次元培養表皮を用いた保湿性試験

試料に、株式会社 E&C ヘルスケア社より提供して頂いたブタ大動脈由来有用成分を使用した。第 2 章「2-3-4-1」と同様の方法で行った。

3-3-3-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験

試料を濃度 10、20 mg/mL に D.W. で調製し、第 2 章「2-3-4-2」と同様に行った。

3-4. Results

3-4-1. 有用成分の収量及び収率

ブタ大動脈組織およびマグロ動脈球組織から得られた有用成分の収量・収率を Table 14 に示した。ブタ大動脈組織から抽出された有用成分は、マグロ動脈組織に比べ収量・収率が低かった。これはブタ大動脈組織を可溶化した際、脱脂後の組織であるにも関わらず多くの脂を含んでおり、その除去操作としてろ過を行ったため、結果として試料の損失に至った。一方、マグロ動脈球由来有用成分については、水溶性エラスチン (Table 3) に比べ高い収量・収率であった。

Table 14. 動物組織由来有用成分の収量・収率

由来	使用した重量(g)	収量 (g)	収率 (%) *
ブタ大動脈	40	4.27	10.7
マグロ動脈球	40	9.19	23.0

*収率は、使用した重量に対する収量の割合を算出した。

3-4-2. 有用成分の分子量分布

Fig. 20 に、動物組織由来有用成分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布を示した。ブタ大動脈由来有用成分 (a)、マグロ動脈由来有用成分 (b) は分子量 670,000 以上がそれぞれ 4.22%、1.33%含まれており、分子量 1,350 にかけて幅広く分布した。各々において 44,000 以上の分子量は、それぞれ 26.88% (a)、20.15% (b) であった。

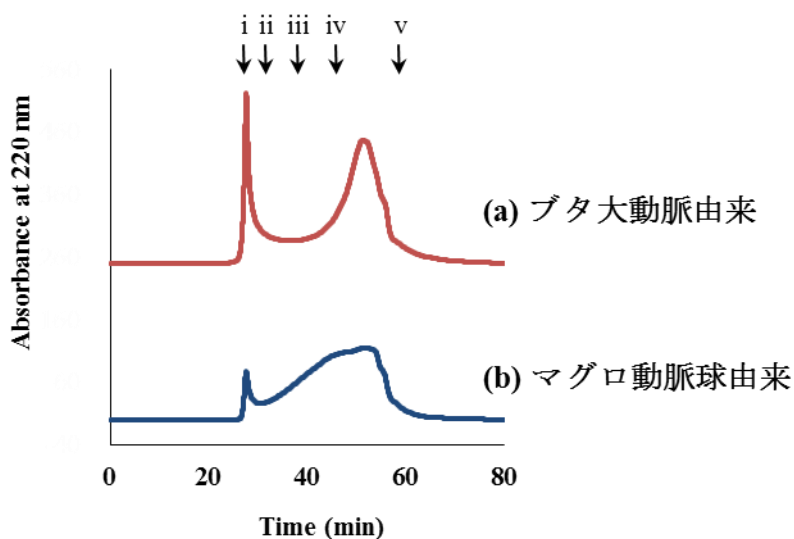


Fig. 20. 動物組織由来有用成分のゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布
標準試料: (i) チログロブリン (分子量 670,000)、(ii) γ -グロブリン (分子量 158,000)、
(iii) オボアルブミン (分子量 44,000)、(iv) ミオグロビン (分子量 17,000)、(v) ビ
タミン B₁₂ (分子量 1,350)

3-4-3. 有用成分のアミノ酸組成

動物組織由来有用成分のアミノ酸組成（モル相対比%）を、Table 15 に示した。ブタ動脈球由来とマグロ動脈球由来有用成分を比較すると、それぞれを構成するアミノ酸において違いが見られた。特に、エラスチンに特有であるアミノ酸 Des、Ide は、マグロ動脈由来よりもブタ大動脈由来有用成分に多く存在した。これは、水溶性エラスチンの結果（Table 6）と同様であり、生物種および組織における Des、Ide の含有量が異なることを示した。また、ブタ大動脈由来有用成分において、コラーゲンを主に構成するアミノ酸である Hyp がブタ大動脈由来水溶性エラスチンよりも含有量が多く、有用成分中にはコラーゲンが残存していることが示唆された。

Table 15. 動物組織由来有用成分のアミノ酸組成の比較（モル相対比%）

成分名	ブタ大動脈	マグロ動脈球
Asp+Asn	5.3	5.3
Thr	0.5	4.7
Ser	0.6	2.7
Glu+Gln	8.6	7.7
Gly	19.6	21.2
Ala	16.4	10.8
Val	9.0	7.4
Met	0.5	0.7
Ile	2.6	3.3
Leu	7.8	5.8
Tyr	2.0	3.7
Phe	3.9	3.5
Lys	3.2	2.6
His	0.8	1.0
Arg	0.5	3.2
Hyp	3.3	1.1
Pro	15.1	15.0
Des	0.18	0.03
Ide	0.21	0.07
Des+Ide	0.39	0.10
Gly+Ala+Val+Pro	60.1	54.4
Asp+Glu	13.9	13.0
Lys+His+Arg	4.5	6.8

3-4-4. 濁度測定におけるコアセルベーション能の評価

Fig. 21 に、ブタ大動脈由来、マグロ動脈球由来有用成分の濁度測定結果を示した。両者共に、濃度 2.0 mg/mL において温度に対して可逆的なコアセルベーション能を示した。水溶性エラスチン (Fig. 13 (a)、Fig. 14 (a)「2-4-6」) の結果と比較すると、ブタ大動脈由来有用成分はほぼ同様の時間からコアセルベーションを開始した。一方、マグロ動脈球由来有用成分は 25℃付近から 65℃にかけて緩やかな濁度曲線を示し、水溶性エラスチンよりも弱いコアセルベーション能であった。

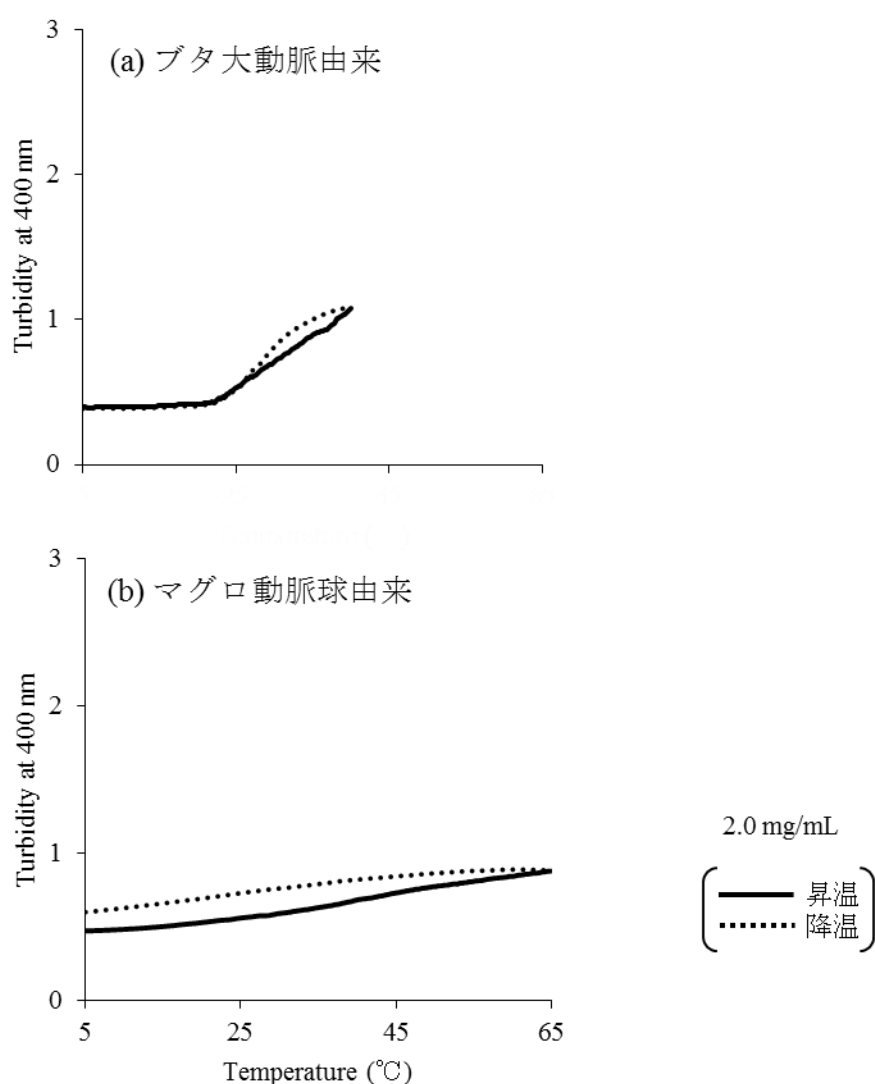


Fig. 21. 動物組織由来有用成分のコアセルベーション

3-4-5. 有用成分中のヒアルロン酸及びラミニン量

動物組織由来有用成分、および水溶性エラスチン中におけるヒアルロン酸含有量を Table 16 に示した。ヒアルロン酸含有量は、ブタ大動脈およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいてもわずかに検出されたが、有用成分においてより多く検出された。また、 $P < 0.01$ で有用成分と水溶性エラスチンの間に有意差が確認された (Fig. 22)。

Table 17 に動物組織由来有用成分、および水溶性エラスチン中におけるラミニン含有量を示した。ブタ大動脈およびマグロ動脈球由来水溶性エラスチンにおいて、ラミニンは検出されなかった。しかし、各々の有用成分においては、微量ではあるが検出された (Fig. 23)。

Table 16. 動物組織由来物のヒアルロン酸含有量

由来	試料	ヒアルロン酸含有量 (ng/mL)	データ数 (n)
ブタ大動脈 (0.25 mg/mL あたり)	有用成分	$3.43 \pm 0.36^{\ddagger}$	16
	水溶性エラスチン	$1.92 \pm 0.15^{\ddagger}$	
マグロ動脈球 (0.05 μ g/mL あたり)	有用成分	$7.77 \pm 0.064^{\ddagger}$	8
	水溶性エラスチン	$3.86 \pm 0.32^{\ddagger}$	

\ddagger 標準偏差

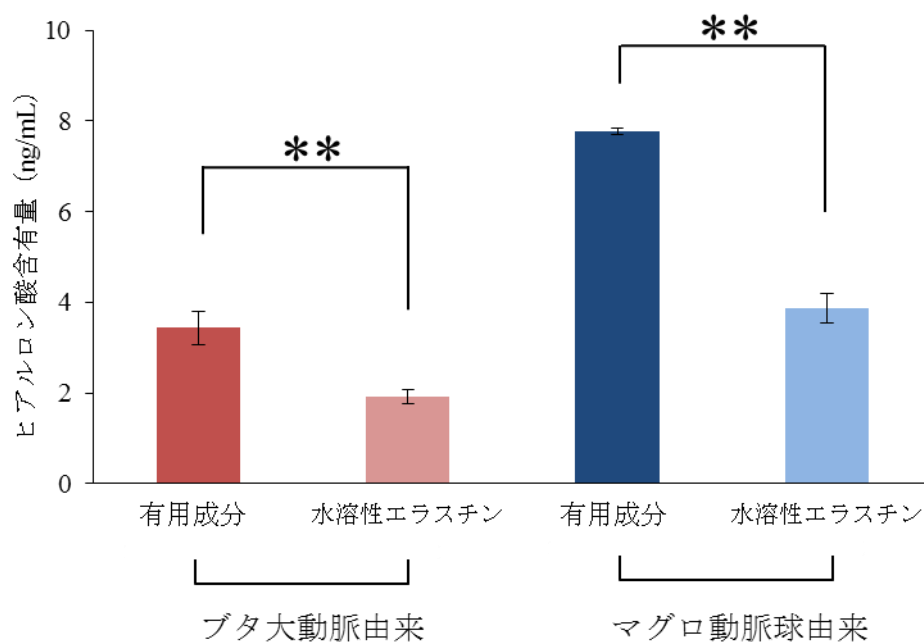


Fig. 22. 動物組織由来物のヒアルロン酸含有量の比較

** $P < 0.01$ において有意差あり

Table 17. 動物組織由来物のラミニン含有量 (1.0 mg/mL あたり)

由来	試料	ヒアルロン酸含有量 (ng/mL)
ブタ大動脈	有用成分	$0.6 \pm 0.85^{\ddagger}$
	水溶性エラスチン	—
マグロ動脈球	有用成分	$1.6 \pm 2.26^{\ddagger}$
	水溶性エラスチン	—

\ddagger 標準偏差 (n=2)

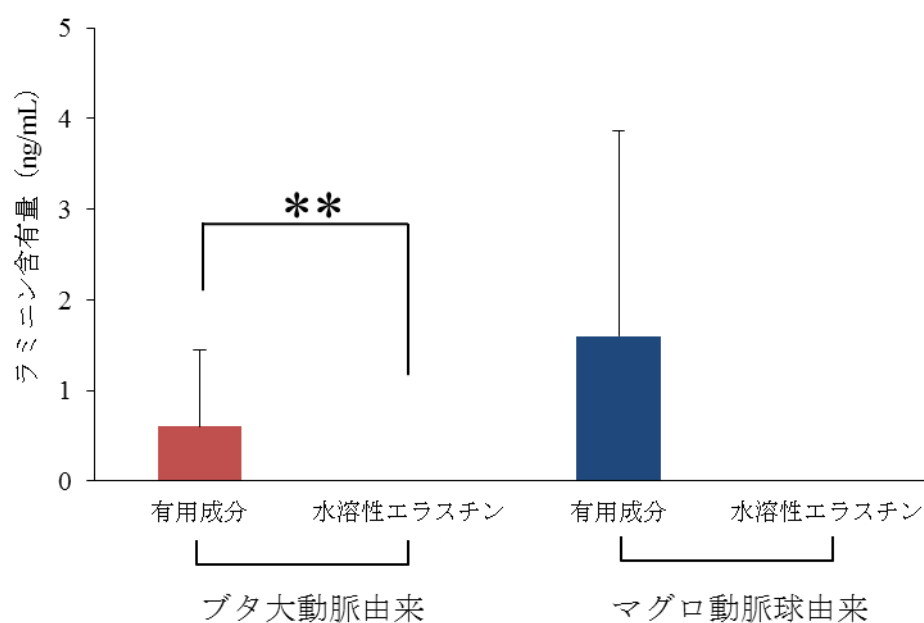


Fig. 23. 動物組織由来物のラミニン含有量の比較 (1.0 mg/mL あたり)

** $P < 0.01$ において有意差あり

3-4-6. ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験

Table 18 に、ブタ大動脈由来有用成分（E&C 社製）におけるヒト3次元培養表皮に対する皮膚内含水率を示した。

Fig. 24 より、3次元培養皮膚における皮膚内含水率はブタ大動脈由来有用成分（E&C 社製）の添加濃度 0、0.02、0.1、1.0% (w/w) に対して、濃度依存的に向上する傾向が見られた。また、ブタ大動脈由来有用成分（E&C 社製）は 1.0% (w/w) において、0% (w/w) との間で有意差が確認された ($P < 0.05$)。1.0% (w/w) では、0% (w/w) と比較して約 19.9% も皮膚内含水率が向上した。

Table 18. ブタ大動脈由来有用成分の皮膚内含水率

濃度 (% (w/w))	皮膚内含水率 (%)
0	52.37 ± 1.23 [‡]
0.02	51.29 ± 1.74 [‡]
0.1	57.74 ± 0.76 [‡]
1.0	72.23 ± 13.55 [‡]

[‡]標準偏差 (n=3)

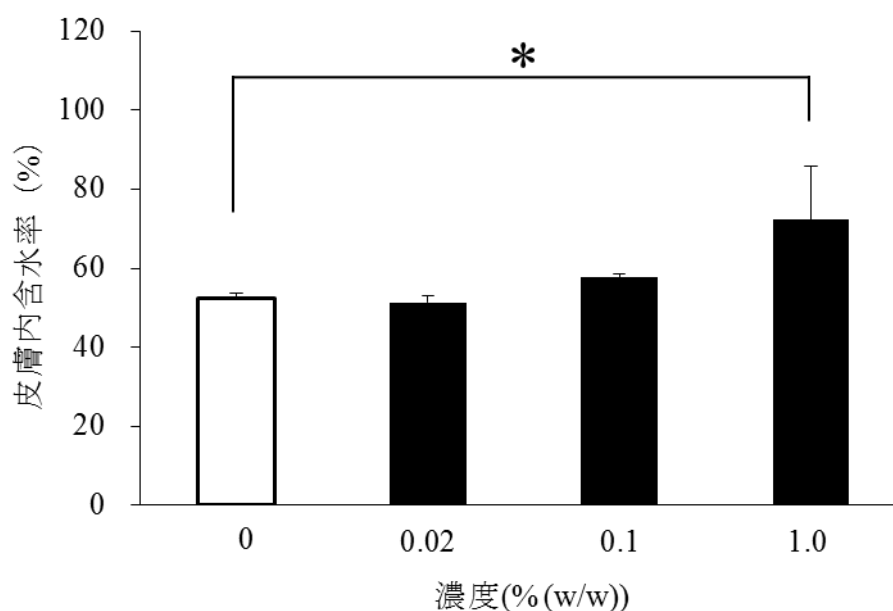


Fig. 24. ブタ大動脈由来有用成分の皮膚内含水率の比較

* $P < 0.05$ において有意差あり

3-4-7. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験

動物組織から精製した有用成分におけるマッシュルーム由来チロシナーゼの阻害率を、Table 19 に示した。ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来有用成分は、濃度依存的にチロシナーゼの活性を阻害した。また、それぞれ濃度 0 mg/mL と 10、20 mg/mL の間で有意差が確認された ($P < 0.05$ 、Fig. 25)。チロシナーゼ阻害率は、水溶性エラスチン (Table 11) と同様に、マグロ動脈球由来においてブタ大動脈由来有用成分の方が強い結果であった。

Table 19. 動物組織から抽出した有用成分のチロシナーゼ阻害率

有用成分	濃度 (mg/mL)	阻害率 (%)
ブタ大動脈由来	10	$0.39 \pm 1.58^{\ddagger}$
	20	$8.8 \pm 3.08^{\ddagger}$
マグロ動脈球由来	10	$15.1 \pm 6.11^{\ddagger}$
	20	$20.5 \pm 6.20^{\ddagger}$

\ddagger 標準偏差 (n=9)

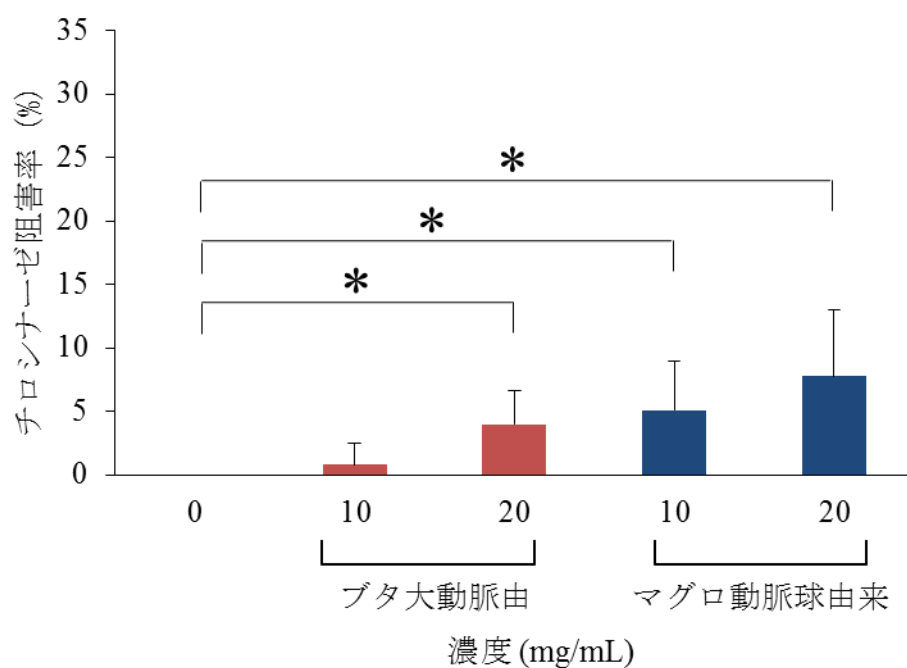


Fig. 25. 動物組織から抽出した有用成分のチロシナーゼ阻害率の比較

* $P < 0.05$ において有意差あり

3-5. Discussion

第2章では、ブタ大動脈およびマグロ動脈球より水溶性エラスチンを精製し、簡便化を図るため脱塩方法について検討を行った。精製した動物組織由来水溶性エラスチンを用いた応用検討を行ったところ、有用な知見が得られた。第3章では、水溶性エラスチンに対する素材としての応用範囲をより広げることを目指した。これまで水溶性エラスチンをより高純度に精製することを目的としてきたが、市場では健康食品や化粧品などの原材料においてエラスチンのみであるといった商品はほぼ存在しない。そこで、エラスチンのみを精製してきた動物組織より、エラスチンと共に有用成分の抽出とその応用に対して検討を行った。

動物組織を効率的に可溶化するため、使用する動物組織を乾燥し粉碎させた。また、可溶化に用いる NaOH の使用量を検討し、水溶性エラスチンを精製する際よりも多量に用いた。Table 14 より、ブタ大動脈およびマグロ動脈球より抽出した有用成分は、水溶性エラスチンのみを精製した場合 (Table 3) に比べ、高い収量・収率であった。これは、可溶性タンパク質の除去工程を省いたことによるものであると考えられる。

ブタ大動脈由来およびマグロ動脈球由来有用成分は、水溶性エラスチンと同様に分子量 1,350 から 670,000 にかけて幅広く分布した。しかしながら、水溶性エラスチンと比較すると分子量 44,000 以上の占める割合が異なり、水溶性エラスチンは約 42 - 52% (Fig. 9) であるのに対し、動物組織由来有用成分は約 20 - 27% であった。この結果から、動物組織由来有用成分には 44,000 以下の分子量が、約 73% 以上と多く含まれた。

動物組織由来有用成分のアミノ酸組成は、ブタ大動脈組織由来とマグロ動脈球由来で異なった (Table 15)。これは、生物種および生体組織を構成するタンパク質、つまりアミノ酸含有量に起因する。ブタ大動脈由来はマグロ動脈球由来有用成分と比較して、Glu+Gln、Ala、Val、Leu、Phe、Lys、Hyp、Des+Ide の含有量が高い傾向が見られた。一方、マグロ動脈球由来では、Thr、Ser、Gly、Met、Ile、Tyr、His、Arg の含有量が高い傾向が見られた。Des+Ide について、マグロ動脈球にはブタ大動脈と比較すると僅かな含有量であった。動物組織由来水溶性エラスチンと有用成分のアミノ酸組成を比較すると、各アミノ酸の含有量が異なった。ブタ大動脈由来有用成分と水溶性エラスチンを比較すると、Asp+Asn、Thr、Glu+Gln、Met、Lys、His、Arg、Hyp の含有量が増加した。また、マグロ動脈球由来有用成分では、ブタ大動脈と同様に Asp+Asn、Thr、Glu+Gln、Met、Lys、あるいはブタ大動脈とは異なり Ala、Ile、Leu、Tyr の含有量がわずかに増加した。有用成分の抽出 (Fig. 19) では、水溶性エラスチン精製 (Fig. 6) において、動物組織から不溶性エラスチンを精製するために行う希アルカリ処理の工程を省いたことにより、上述したアミノ酸が保存されたと考える。特に Hyp は、コラーゲンやエラスチンに特有に含まれており、コラーゲンにおいては全体のアミノ酸量に対して約 10% を占める。ブタ大動脈由来有用成分において、Hyp の含有量は 1.9% から 3.3% に増加した。この結果は、有用成分においてコラーゲン量が増加したことを示している。しか

しながら、マグロ動脈球由来有用成分においては、ほとんど変化が見られなかった。カツオ動脈球組織では、70 - 90%の弾性線維が含まれていることが報告されている [53]。そのため、マグロ動脈球組織も同様に組織自体に含まれるコラーゲン量、すなわち Hpro 量が少ないため、マグロ動脈球由来有用成分および水溶性エラスチンにおいて Hyp の量は変化しなかったのではないかと考えられる。

ブタ大動脈由来有用成分において、水溶性エラスチンとほぼ同様の開始温度からコアセルベーション能を示したが、吸光度は低い値であった (Fig. 13 (a)、Fig. 21 (a))。マグロ動脈球由来については、水溶性エラスチンと比較し非常に緩やかな濁度曲線を示した (Fig. 14 (a)、Fig. 21 (b))。動物組織由来有用成分は、水溶性エラスチンに特有であるコアセルベーション能を示したが、比較的弱い能力であった。エラスチンのコアセルベーションについて、(VPGVG)から成るアミノ酸の繰り返し配列が起因している [38、39]。アミノ酸分析において、動物組織由来水溶性エラスチンと有用成分のアミノ酸組成は若干変化が見られた。また、精製時の熱アルカリ処理により分断化される部位が変化し、それぞれに保持されているアミノ酸配列が異なっている可能性があると考えられる。

ここまでの結果から動物組織由来有用成分は、水溶性エラスチンよりも弱いコアセルベーション能を有し、ブタ大動脈由来有用成分においては水溶性エラスチンよりもコラーゲン量がわずかに多く含まれていることが分かった。さらに、その他どのような成分が含まれているかを確認するため、ヒアルロン酸、ラミニンについて ELISA によって定量を行った。ヒアルロン酸は、動物組織由来有用成分および水溶性エラスチンにおいて、両者共に検出された。しかしながら、各々の間には $P < 0.01$ で有意な差が確認され、有用成分において多く含まれた (Fig. 22)。ラミニンは、基底膜を構成する高分子タンパク質でありコラーゲンなどの成分と結合し合い、その構造を形成している。アミノ酸分析の結果、ブタ大動脈由来有用成分において水溶性エラスチンよりもコラーゲン含有量に顕著な差が見られたため、ラミニンについても検出されるのではないかと考えた。その結果、動物組織由来有用成分においてのみラミニンが微量であるが検出された。ヒアルロン酸は、保湿作用を示すことが報告されており [62]、ラミニンについては、細胞接着、器官形成、神経網再生、血管新生など様々な生命現象に関与している [78]。これらを含む動物組織由来有用成分は、水溶性エラスチンよりも多くの生理活性を有することが考えられ、有用な素材であると考えられる。エラスチンのコアセルベーションは、(VPGVG)から成るアミノ酸の繰り返し配列に起因している [38、39]。動物組織由来では、どのような配列が温存されているか不明である。ただ、今回アミノ酸分析からは、ブタ大動脈由来有用成分および水溶性エラスチンでは、Gly、Ala、Pro、Val の順で、マグロ動脈球由来では、Gly、Pro、Ala、Val と Glu+Gln の順で多く含有されていた。今後、アミノ酸分析だけでなくどのようなアミノ酸配列が保持されているかを確認することでコアセルベーション能の違いを明らかにすることができるだろう。

次に、動物組織より抽出した有用成分の応用検討として、水溶性エラスチンと同様に

ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験を行った。実際、商品としての応用を考え E&C 社が当研究室の精製方法に基づいて製造したブタ大動脈由来有用成分を使用した。その結果、ブタ大動脈由来有用成分は水溶性エラスチンと同様に、濃度依存的に皮膚内含水率が向上した。また、濃度 0% (w/w) と 1.0% (w/w) の間で有意差が確認された ($P < 0.05$)。濃度 1.0% (w/w) においては、0% (w/w) よりも皮膚内含水率が 20% (w/w) も向上した (Fig. 24)。Table 10 より、水溶性エラスチン (ファームエラスチン®) では、16% (w/w) の向上であった。この結果から、水溶性エラスチンよりも有用成分の方が皮膚内含水率の向上に対して寄与する傾向にあることが分かった。これは、おそらくコラーゲンやヒアルロン酸などの含有量が有用成分において多く含まれていたことが要因であると考えられる。また、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験を行ったところ、動物組織由来有用成分は、ブタ大動脈由来、マグロ動脈球由来それぞれにおいて、濃度 0 mg/mL と 20 mg/mL、10 mg/mL と 20 mg/mL の間で有意差が確認された ($P < 0.05$, Fig. 25)。そして、両者共に水溶性エラスチン (Table 13) よりも強い阻害活性を示し、特にマグロ動脈球由来において、ブタ大動脈由来よりも比較的強い阻害活性が見られた。濃度 20 mg/mL のマグロ動脈球由来水溶性エラスチンはチロシナーゼ阻害率が約 8%であったが、有用成分では約 21%であり、約 13%も向上した。チロシナーゼ阻害には、Cys が関与している [79]。しかしながら、動物由来有用成分および水溶性エラスチンには、Cys が含まれていない。チロシナーゼ阻害に関する研究では、アミノ酸 20×20 のジペプチドの与える影響を網羅的に調べたところ、Pro-Asp、Asp-Tyr、Tyr-Lys においてチロシナーゼの活性を、60 - 70%阻害したと報告されている [80]。動物組織由来有用成分および水溶性エラスチンにおいて、穏やかながらチロシナーゼ阻害活性を示したのは、上述したアミノ酸配列によるものだと考える。また、動物組織由来有用成分において、これらのアミノ酸はわずかに増加しており、そのため有用成分においてチロシナーゼ阻害活性率が向上したのではないかと推測する。

第 4 章

エラスチン様フェニルアラニン含有 短鎖自己集合性ペプチドの応用

4-1. Introduction

第2章、第3章においては、動物組織を用いた検討を行ってきた。これに対して第1章「1-5」で記載した通り、VPGVGの繰り返し配列を基盤とした合成ペプチドの研究も多く報告されている。そこで、VPGVG配列の1位のValをより疎水度の高いPheに置換したフェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドであるH-(FPGVG)₅-NH₂（以下(FPGVG)₅と略）において、バイオマテリアルとしての応用、水溶性エラスチンと同様に化粧品への応用を検討した。当研究室では、これまで(FPGVG)₅を用いて種々の検討を行ってきた[81、82]。本研究では、バイオマテリアルとしての応用を考え、生理食塩水を用いた生体条件下においてコアセルベーションの測定を行った。また、ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）との相互作用について確認し、(FPGVG)₅の化粧品素材としての応用を検討した。さらに、利便性の高いコアセルベーション能を利用した温度応答性培養皿、 γ 線照射によるナノ粒子の作製について検討した。

4-2. Materials

Cell Counting kit-8	株式会社同仁化学研究所
DOPA	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco™
Ethanol	和光純薬工業株式会社
FBS	Gibco™
Fungizone, liquid	インビトロジェン株式会社
Gentamicin (50mg/mL)	インビトロジェン株式会社
Hank's Balanced Salt Solutions liquid	インビトロジェン株式会社
H-(FPGVG) ₅ -NH ₂ (MW : 2305)	当研究室にて作製
Normal Human Dermal Fibroblasts Cells	三光純薬株式会社
Penicillin/streptomycin	インビトロジェン株式会社
0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA・4Na	インビトロジェン株式会社
生理食塩水	大塚製薬株式会社
炭酸水素ナトリウム (NaHCO ₃)	和光純薬工業株式会社

4-3. Methods

4-3-1. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの濁度測定におけるコアセルベーション能の評価

試料調製には D.W. および生理食塩水を使用した。(FPGVG)₅ は D.W. を用いて濃度 10、20、30 mg/mL、生理食塩水を用いて 10、20 mg/mL へ調製した。その後の操作は、第 2 章「2-3-3-3」と同様の方法で行った。

4-3-2. 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する相互作用の確認

凍結保存された正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を、抗生物質として Penicillin/streptomycin (2.5 mL/500 mL)、Fungizone liquid (4.0 mL/500 mL)、Gentamicin (0.5 mL/500 mL) を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、10% FBS) を使用し [83]、37°C (5.0% CO₂) でサブコンフルエント (70 - 90 %) になるまで培養した。そして、培地をアスピレーターで除去し、Hank's Balanced Salt Solutions liquid 5.0 mL/dish を加えて洗浄した。この操作を 2 回行った後、蛋白質分解酵素として Trypsin 3.0 mL/dish を加え、37°C で 3 分間置いた。酵素反応を停止させるため、DMEM (10% FBS) を 7.0 mL/dish 添加した。得られた細胞懸濁液を遠心分離 (1000 rpm、25°C、5 分間) し、上清を除去しペレットを回収した。そして、DMEM (0.5% FBS) を使用し細胞数 5.0×10^4 cells/mL に調製し 96 well プレートに 100 μ L ずつ播種し、37°C (5.0% CO₂) で 48 時間同調培養した。そして、培地を除去し (FPGVG)₅ を濃度 10^{-6} 、 10^{-7} M (溶媒: DMEM (0% FBS)) で添加し、さらに 37°C (5.0% CO₂) で 48 時間培養した。その後、高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として用いている Cell counting kit-8 を既存のプロトコルに従って使用し、波長 450 nm における吸光度を測定した。比較として、通常の培養に用いる DMEM (10% FBS) および試料調製に用いた DMEM (0% FBS) を添加し、増殖傾向を比較した。細胞数は、検量線を用いて算出した。

4-3-3. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの応用

4-3-1 より、エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドは、生体条件下において、コアセルベーション能が向上した。そして、NHDF に対して何の影響も与えないということが分かった。これらの基礎的な結果から、バイオマテリアルとしての応用を検討した。

4-3-3-1. ヒト 3 次元培養表皮を用いた保湿性試験

(FPGVG)₅ の濃度は D.W. で 1.0 % に調製した。その後の操作は、第 2 章「2-3-4-1」と同様の方法で行った。

4-3-3-2. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験

(FPGVG)₅を濃度 5.0、10 mg/mL になるように D.W.で調製した。その後の操作は、第 2 章「2-3-4-2」と同様に行った。

4-3-3-3. 温度応答性培養皿の作製

(FPGVG)₅を濃度 20 mg/mL になるように D.W.で調製し、24 well プレート上（培養面積：1.88 cm²）に 250 μ L 添加した。滅菌のため、UV を 30 分間照射し 37°C に 2 - 3 時間置きコアセルベート層を形成させた。その後、溶媒を除去しコアセルベート層のみが 24 well プレート上に堆積した状態にした。そして、NHDF を播種し、37°C（5.0% CO₂）で 24 - 48 時間培養した。

4-3-3-4. γ 線照射によるナノ粒子化及び粒子径測定

(FPGVG)₅を濃度 20 mg/mL に D.W.で調製した。その後の操作は、第 2 章「2-3-4-3」と同様に行った。ただし、照射前に 50°C に設定した恒温槽を利用し、試料溶液の分子が集合し白濁した状態つまりコアセルベーションした状態にした。

4-4. Results

4-4-1. エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの濁度測定によるコアセルベーション能の評価

エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドである(FPGVG)₅について、溶媒に D.W.を用いた濁度測定結果を Fig. 26 に示した。濃度 10 mg/mL ではコアセルベーション能を示さなかったが、濃度 20、50 mg/mL と増加させることでコアセルベーション能を示すようになり、濃度依存的にコアセルベーションの開始温度が低温側にシフトした。50 mg/mL においては、15°C 付近で直線的な濁度の立ち上がりを示した。

Fig. 26 (b) では、溶媒に生理食塩水を用いた濁度測定結果を示した。濃度 10 mg/mL において、溶媒が D.W.ではコアセルベーションを示さなかったが、生理食塩水ではコアセルベーション能を示した。また、20 mg/mL では D.W.における 50 mg/mL とほぼ同様の時間からコアセルベーションを開始した。この結果から、溶媒に生理食塩水を用いることにより、(FPGVG)₅のコアセルベーション能は向上するということが分かった。

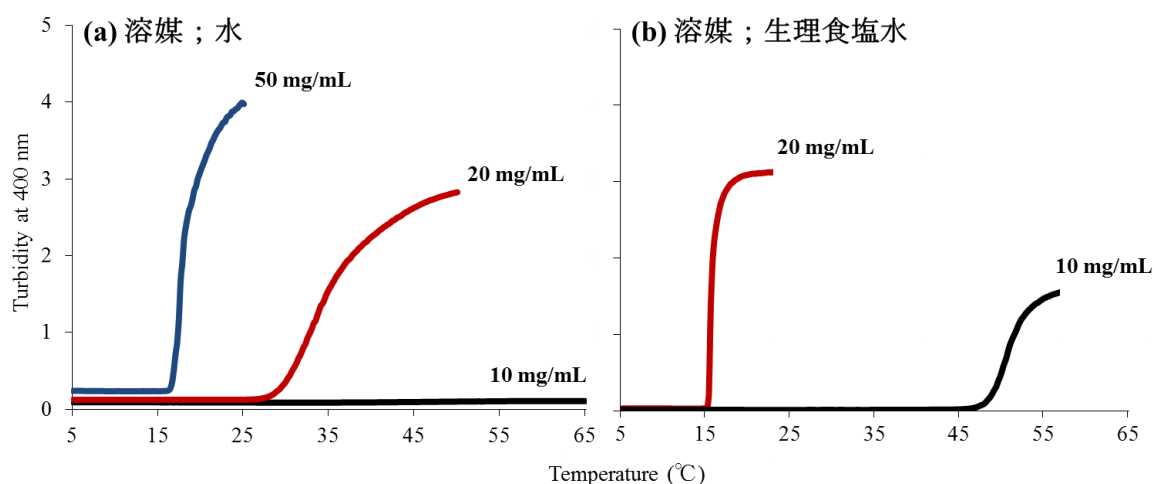


Fig. 26. 溶媒が異なる(FPGVG)₅溶液のコアセルベーションの比較

4-4-2. 正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する相互作用の確認

(FPGVG)₅のNHDFに対する増殖結果を、Fig. 27に示した。(FPGVG)₅は、溶媒として使用したDMEM (0% FBS)と同様の細胞増殖能であり、NHDFに対して増殖能や毒性を示さず、NHDFの増殖に影響を及ぼさないということが示唆された。

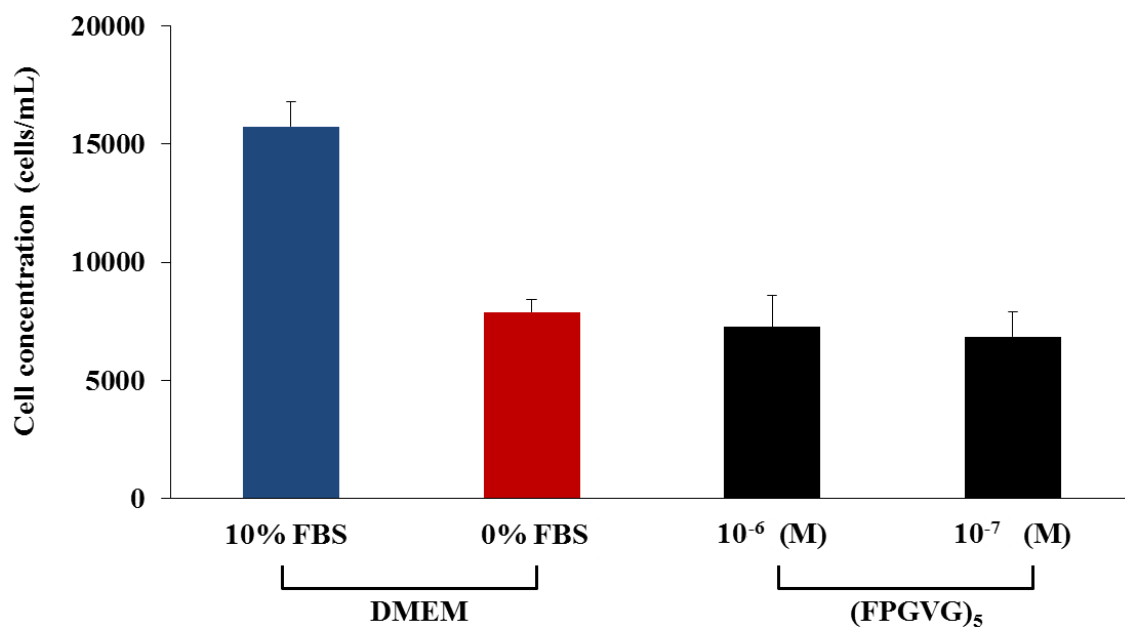


Fig. 27. (FPGVG)₅のNHDFに対する増殖能

4-4-3. ヒト 3 次元培養表皮を用いた保湿性試験

(FPGVG)₅ のヒト 3 次元培養表皮に対する皮膚内含水率を、Table 20 に示した。
(FPGVG)₅ は、濃度 1.0% (w/w) において 0% (w/w) との間で有意差が確認された ($P < 0.05$ 、Fig. 28)。

Table 20. (FPGVG)₅ の皮膚内含水率

濃度 (% (w/w))	皮膚内含水率 (%)
0	60.13 ± 7.31 [‡]
1.0	67.71 ± 14.59 [‡]

[‡]標準偏差 (n=3)

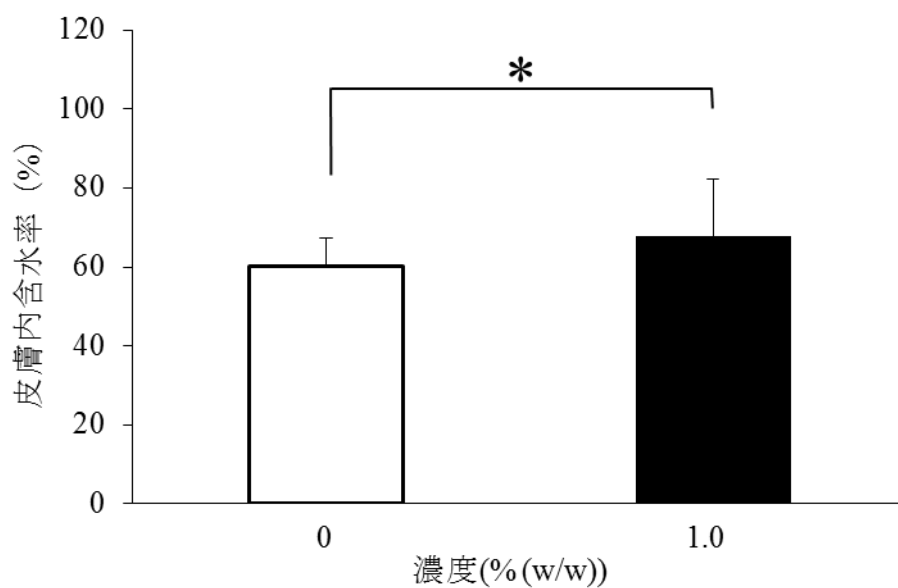


Fig. 28. (FPGVG)₅ の皮膚内含水率

* $P < 0.05$ において有意差あり

4-4-4. マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験

(FPGVG)₅におけるマッシュルーム由来チロシナーゼの阻害率を、Table 21 に示した。(FPGVG)₅は、濃度 5.0 mg/mL ではチロシナーゼの活性を阻害しなかったが、10 mg/mL において穏やかな阻害率を示した。また、各々の間で有意差が確認された ($P < 0.05$ 、Fig. 29)。

Table 21. (FPGVG)₅ のチロシナーゼ阻害率

濃度 (mg/mL)	阻害率 (%)
5.0	0
10	$5.75 \pm 3.35^{\ddagger}$

\ddagger 標準偏差 (n=9)

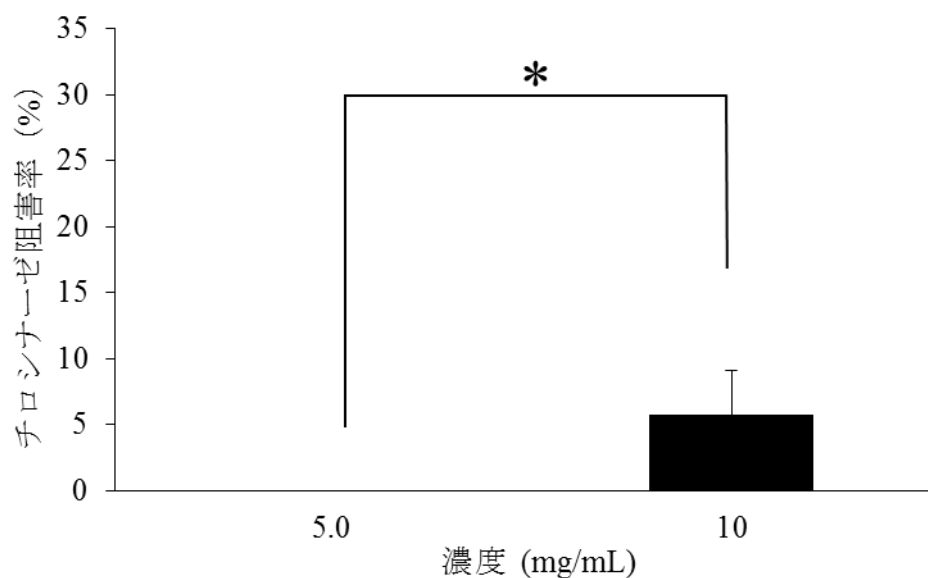


Fig. 29. (FPGVG)₅ のマッシュルーム由来チロシナーゼ阻害率

* $P < 0.05$ において有意差あり

4-4-5. 温度応答性培養皿からの細胞シートの回収

(FPGVG)₅を使用した温度応答性培養皿上で培養した NHDF の様子と、その培養皿上より温度を低温 (4℃) に処理することで回収された細胞シートの様子を Fig. 30 に示した。(A) において示した矢印の部分は、低温処理によって NHDF が自動的に剥がれ包埋している状態である。(B) において、楕円形で囲っている部分を見ると、NHDF は個々の細胞間の結合を保持したままの状態であることが確認された。

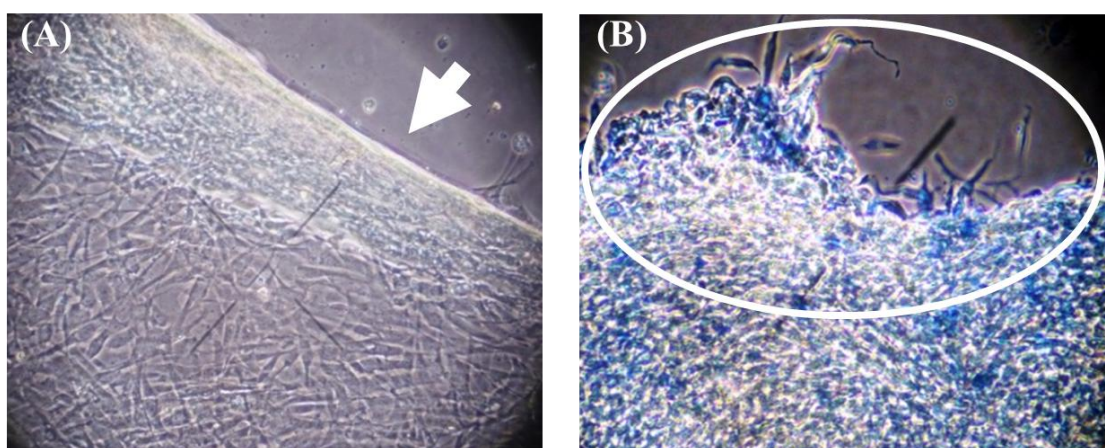


Fig. 30. (FPGVG)₅を使用した温度応答性培養皿より低温処理により得られた細胞シート
(A) (FPGVG)₅を使用した温度応答性培養皿上で見られた NHDF が剥離した様子
(B) (A) を回収後の細胞シートの様子 (Trypan blue にて染色)

4-4-6. γ 線照射により得られたナノ粒子の粒子径

γ 線照射後の(FPGVG)₅における粒子径の大きさを Table 22 に示した。(FPGVG)₅ は、581.8 nm 前後の粒子が 89% 存在した。

Table 22. γ 線照射(FPGVG)₅により得られた粒子径

粒子径 (nm)	存在比 (%)
11.7 ± 1.20	0.80
113.6 ± 18.4	9.4
581.8 ± 98.3	89.8

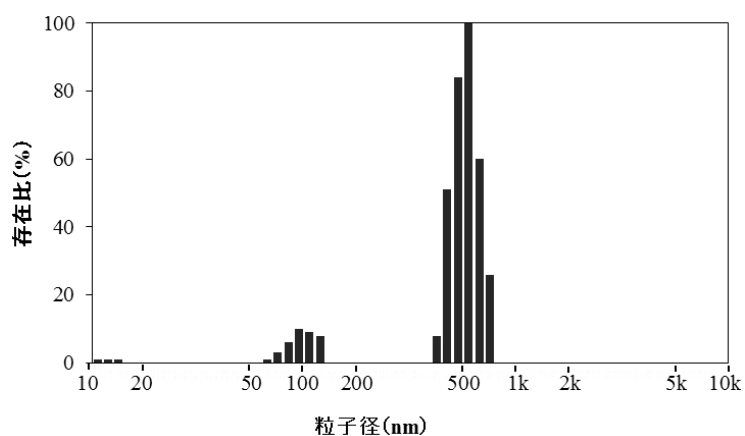


Fig. 31. γ 線照射(FPGVG)₅により得られた粒子径の分布

4-5. Discussion

第4章では、エラスチン様ペプチドである(VPGVG)_nの繰り返し配列をもとに、当研究室が開発したフェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドであるH-(FPGVG)₅-NH₂（以下(FPGVG)₅と略）について、水溶性エラスチンと同様に化粧品への応用、およびバイオマテリアルへの応用を検討した。

エラスチン様ペプチドである(VPGVG)_nは、濃度40 mg/mLにおいてn≤9ではコアセルベーション能を示さず、n=10でわずかにコアセルベーション能を有することが報告されている[84]。一方、1位のValの疎水度を向上させIleに置換した(IPGVG)_nでは、n=7-10で同様の濃度においてコアセルベーション能を示し[85]、さらに疎水度を向上させPheに置換したところ、(FPGVG)₅において最も強いコアセルベーション能を示した[81]。Fig. 26より、(FPGVG)₅は濃度10 mg/mLではコアセルベーション能を示さなかったが、20、50 mg/mLと増大させることにより、濃度依存的にコアセルベーション開始温度が低温側にシフトした。(FPGVG)₅のバイオマテリアルへの応用を考え、生体条件下での検討を行った。その結果、溶媒に生理食塩水を使用したところ、溶媒がD.W.ではコアセルベーション能を示さなかった濃度10 mg/mLにおいて、温度が50℃付近よりも前でコアセルベーションを開始した。また、濃度20 mg/mLにおいては溶媒がD.W.における50 mg/mLと同様の温度からコアセルベーションを開始し、直線的な濁度曲線が得られた。これは、塩析効果が働いたためであると考えられる。

動物組織由来水溶性エラスチンおよび有用成分と同様に、(FPGVG)₅に対して、化粧品素材としての有用性を評価した。まず、ヒト3次元培養表皮を用いた保湿性試験において、(FPGVG)₅は濃度0%と1.0%の間で有意差が確認された($P < 0.05$, Fig. 28)。また、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性試験において、濃度5.0 mg/mLでは阻害率が0%であったのに対し、10 mg/mLへ増大させると阻害率は約5.8%となり、各々の間で優位な差が確認された($P < 0.05$, Fig. 29)。(FPGVG)₅は化粧品への応用において、動物由来水溶性エラスチンおよび有用成分よりも効果がやや劣った。しかしながら、(FPGVG)₅を構成するアミノ酸のうちProは、動物由来水溶性エラスチンおよび有用成分にも多く含まれていたが(Table 6、Table 15)、特にコラーゲンに多く含まれており、Proを含むコラーゲンジペプチドの研究では、ヒト真皮線維芽細胞の活性化と共に、ヒアルロン酸量を増加させ、健やかな皮膚の状態を維持することに有用であることが示されている[86]。またPheについては、動物由来水溶性エラスチンおよび有用成分中にわずかに含まれたが、白斑治療に関する研究では、皮膚にPheを塗布したところ、皮膚病変が緩和されたことから、皮膚保護作用を持つと考えられている[87]。これらの報告より、(FPGVG)₅も化粧品素材として有用な素材である可能性があると考えられる。それを確認するために、引き続き他の検討を行う必要がある。

エラスチンのヘキサペプチド(VGVAPG)は、線芽細胞に対して増殖能を有することが知られており [88]、動物由来水溶性エラスチンにおいても同様のことが報告されている [89]。そこで、(FPGVG)₅ が NHDF に対してどのような作用を及ぼすかを確認したところ、増殖能も悪影響も確認されず毒性を示さないと示唆された (Fig. 27)。(FPGVG)₅ をコーティングした培養皿上で NHDF を培養したところ、通常の接着と増殖を確認した。そして、NHDF がコンフルエントに達した状態において低温 (4℃) 処理することで、トリプシンなどの酵素を使用することなく培養皿上の端の方から自動的に剥がれ、包埋した状態の様子が確認された (Fig. 30 (A)) そして、細胞-細胞間の結合が保持された細胞シートを回収することができた。回収した細胞シートを、顕微鏡を用いて観察すると方錐体上の形状が確認された (Fig. 30 (B))。(FPGVG)₅ は、温度変化によって II 型 β -ターン構造をとることが報告されている [81]。また、配列が異なるエラスチン様ペプチドにおいても、コアセルベーションにより水和したランダムコイルから疎水性の状態である β -ターン構造へとコンフォメーション変化が起き、それにより細胞をシート状に回収する検討がなされている [51]。細胞は、疎水性表面に接着し増殖する性質があるため、NHDF は (FPGVG)₅ をコートした培養皿上に対して接着・増殖することが可能であったと考える。そして、(FPGVG)₅ は温度を低温に置くことにより、コンフォメーション変化が起き、疎水性表面から親水性表面へとシフトし NHDF が培養皿上から剥離したのではないかと考える。ここで、NHDF 表面における (FPGVG)₅ の残留の有無については確認することができておらず、今後検討する必要がある。

(FPGVG)₅ の粒子径サイズは、コアセルベーションを示さない 15℃では 10 nm 程度であり、コアセルベーションを示す 37℃では 60 - 70 nm と粒子径が変化するということが報告されている [81]。本実験において、(FPGVG)₅ に対して γ 線照射したところ、粒子径の大きさは約 581.8 nm が約 90 %を占めた (Table 22)。 γ 線照射することにより、報告されている (FPGVG)₅ の粒子径よりも大きくなったが、今後、 γ 線照射時の (FPGVG)₅ 濃度、 γ 線の照射量などの条件検討を行うことで、安定した粒子を作製することができ、将来的に DDS における薬物担体として応用可能であると考ええる。しかしながら、 γ 線照射によってどのアミノ酸同士が架橋しているのかは、未だ分かっていない。そのため、(FPGVG)₅ のバイオマテリアルへの応用を検討すると同時に、架橋部位を特定することも、学術的には重要である。

第 5 章

結論

動物組織由来水溶性エラスチンは、特有な性質であるコアセルベーション能を示す。コアセルベーションは温度応答性の分子の自己集合、解離の性質である。この性質は生体内におけるエラスチンの弾性機能に重要であると考えられている。エラスチンは、加齢に伴って減少するため、「補う」と言った考え方から健康食品・化粧品素材への使用がなされており、さらには、特有な性質であるコアセルベーション能を利用したバイオマテリアルへの応用も期待されている。これまでの研究では、動物組織から純度の高い水溶性エラスチンのみの精製を目的としてきた。現在、市場に出回っているエラスチンを含む健康食品・化粧品素材の成分中にはエラスチンのみならず、その他、健康や美容に対して有用であると知られている成分が混合されている。そのため、動物組織全体から水溶性エラスチン以外にどのような有用成分が抽出できるかを確認し、素材としての付加価値を高めることが必要である。同様に、動物組織由来水溶性エラスチンの研究が進む中で、エラスチンのコアセルベーション能には VPGVG 配列が関与しているということが明らかとなっている。そこで、当研究室において開発したエラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドである (FPGVG)₅ は、高いコアセルベーション能を有することが確認されており、その有用性を見出すための応用研究が求められる。

本博士論文では、動物組織からの水溶性エラスチンの精製とその応用（第 2 章）、動物組織からの有用成分の抽出とその応用（第 3 章）、エラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドの応用（第 4 章）の順で論述した。

まず、動物組織からの水溶性エラスチンの精製とその応用では、ブタ大動脈組織およびマグロ動脈球組織から精製した水溶性エラスチンにおいて、エラスチンにのみに含まれるアミノ酸である Des、Ide が含まれており、コアセルベーション能を有した。また、同様の動物組織を使用し、水溶性エラスチンのみならず動物組織に存在するエラスチン以外の成分にも着目し、水溶性エラスチン精製における工程の簡略化を行った。その結果、精製された成分には Des、Ide が JHFA の規定する範囲で含まれており [29]、エラスチンに特有であるコアセルベーション能を示した。しかしながら、水溶性エラスチンよりも Hyp を多く含んだため、コラーゲンの存在が確認された。それ以外の成分として、ヒアルロン酸、ラミニンの存在も確認された。そのため、エラスチンを含んだ有用成分の抽出に成功したといえる。動物由来水溶性エラスチンの精製における操作の簡略化として脱塩の方法を変更した場合、各方法において僅かな変化はあったものの、エラスチンに特徴的な成分は温存され、操作の簡略化に成功した。ここで、エラスチンに特徴的な配列を模倣し、当研究室で独自に設計し開発したエラスチン様フェニルアラニン含有短鎖自己集合性ペプチドである (FPGVG)₅ は、上述した動物組織由来物に比べはるかに強いコアセルベーション能を示した。

次に、それぞれの作製物に対する応用として、最初に当研究室でこれまで研究を行ってきた動物由来水溶性エラスチンからバイオマテリアルの素材作製の検討を行った。ブタ大動脈由来水溶性エラスチンおよびコラーゲン混合物は、これらの混合比を調製する

ことでコアセルベーション能の挙動が変化することが確認された。その結果をもとに、ブタ大動脈由来水溶性エラスチンおよびコラーゲン混合物、マグロ動脈球由来水溶性エラスチン、(FPGVG)₅ に対して γ 線照射による分子間架橋を行ったところ、今後の素材作製における有用な結果が得られた。エラスチンまたはエラスチンペプチドにおける γ 線照射による分子間架橋は、どのアミノ酸側鎖が関与しているのかについて未だ不明である。そのため、今後エラスチンペプチドを用いた検討により、分子間架橋に関与するアミノ酸側鎖の解明も必要であるだろう。また、動物組織由来水溶性エラスチンおよび有用成分の化粧品素材としての効果を確認するため、皮膚に対する「保湿性」と「美白」に着目し、*in vitro* における試験を行った。「保湿性」では、ブタ大動脈球由来水溶性エラスチンにおいて有用な結果が得られたため、ブタ大動脈由来有用成分について試験を行ったところ、同様に有用な結果を示すことが明らかとなった。「美白」試験として、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性を行ったところ、「保湿」の結果と反しマグロ動脈球由来水溶性エラスチンおよび有用成分で阻害活性が高い傾向が見られた。しかしながら、マッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性自体、穏やかな阻害率であった。(FPGVG)₅ についても同様の検討を行ったところ、動物由来物と比較するとやや穏やかな効果を示すことが明らかとなった。Phe など芳香環を有するアミノ酸は、天然保湿因子 (NMF) の成分の 1 種として皮膚の水分量を調製し [59]、また白斑の治療に使用されている [91]。また、エラスチン様ヘキサペプチド(VGVAPG)は、メラノサイトやメラノサイト前駆体を分化する作用があり、シミ生成の阻害に関与することが報告されている [92]。これらの報告から、今後 *in vivo* などでの検討を進めて行くことで、さらに化粧品素材としての有用性を示す結果が得られる可能性がある。

本研究では、動物組織より水溶性エラスチンの精製および有用成分の抽出を行った。その結果、動物組織由来水溶性エラスチンについては精製方法の簡便化が可能となった。また、水溶性エラスチン、コラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニンなどを含有する有用成分の抽出に成功した。さらに、水溶性エラスチン、有用成分及び合成ペプチドである (FPGVG)₅ について、素材としての応用に対する基礎的な試験を実施した。その結果、天然の動物組織由来及び合成ペプチドのエラスチンが、いずれもバイオマテリアルや化粧品などの安全な素材として有用であることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くの方々よりご支援とご指導を賜りましたこと、深謝致します。

指導教官である国立大学法人九州工業大学情報工学部前田衣織准教授に深謝致します。前田衣織准教授の研究にかける熱い情熱を感じ、日々、多くのことを学びました。時に応じて厳しくご指導頂いたこと、また優しく激励して下さったことを通じて、私自身の至らなさを実感し、少しでも前進できるよう努める日々でありました。

同専攻引間知広准教授には、実験のみならず学会発表や学術論文執筆にあたりご指導、ご助言を賜りました。

γ 線照射実験は、国立大学法人大阪府立大学、地域連携研究機構・放射線研究センター古田雅一教授のご協力のもと行われました。

国立大学法人九州大学基幹教育院野瀬健教授には、学会発表、学術論文執筆にあたり丁寧なご助言を賜りました。

実験に用いた多くの試料などは、株式会社E&Cヘルスケアよりご提供賜りました。

同専攻研究員谷口卓氏には、本学位論文のみならず学会発表、学術論文執筆、日頃より有益なご討論ご教授を賜りました。また、同専攻前田研究室の皆様には感謝の意を表します。特に、直接ご指導を賜りました土井（旧姓 吉野）絵里香さん、共に実験を遂行しデータを提供してくれた平山裕規君、小野美香さん、古江健人君、高柳千絵さんらには深謝致します。

参考文献

1. 伊藤浩行編：エラスチン－構造・機能・病理－，日本エラスチン研究会（2009）
2. Okamoto, K., Ogura, R., Izumiya, N. *Tanpakushitsu Kakusan koso*, 24, 1471-1486 (1979)
3. 大山俊郎編：弾性線維－病態生理と疾患，協立出版株式会社（1992）
4. 藤本大三郎編：細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー，アイピーシー，pp 1-73（1990）
5. Richards, A.N. Chemical studies of elastin, mucoid and other proteins in elastic tissue with some notes on ligament extractives. *Am. J. Physiol.* 1902; 7: 93-134.
6. Katsuda, S.A., Kajikawa, K. Elastogenesis in experimental arteriosclerosis in rabbits. *J. Electron Microsc.* 1977; 26: 111-119.
7. Lowry, O.H., Gilligan, D.R., Katersky, E.M. The determination of collagen and elastin in tissues with results obtained in various normal tissues from different species. *J. Biol. Chem.* 1941; 139: 795-804.
8. Lansing, A.I., Rosenthal, T.B., Alex, M., Dempsey E.W. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat. Rec.* 1952; 114: 555-575.
9. Partridge, S.M., Davis, H.F., Adair, G.S. The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin*. *Biochem. J.* 1955; 61: 11-21.
10. Sandberg, L.B., Soskel, N.T., Leslie, J.G. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N. Engl. J. Med.* 1981; 304: 566-597.
11. Thomas, J., Elesden, D.F., Partridge, S.M. Partial structure of two major degradation products from the cross-linkages in elastin. *Nature*, 1963; 200: 651-652.
12. Sandberg, L.B., Weissman, N. Smith, D.W. The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta. *Biochemistry*, 1969; 8: 2940-2945.
13. Ross, R., Bornstein, P. Elastic fibers in the body. *Sci. Am.*, 1971; 224: 44-52.
14. Rosenbloom, J. Elastin: reaction of protein and gene structure to disease. *Lab. Invest.*, 1984; 51: 605-623.
15. Indik, Z., Yen, H., Ornstein-Goldstein, N., Shepperd, P., Anderson, N., Rosenbloom, J.C., Peltone, L., Rosenbloom, J. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 5680-5684.
16. Mecham, R.P., Hinek, A., Entwistle, R., Wrenn, D.S., Griffin, G.L., Senior, R.M. Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 1989; 28: 3716-3722.
17. Foster, J.A., Rich, C.B., Miller, M., Benedict, M.R., Richman, R.A., Florini, J.R. Effect of age and IGF-I administration on elastin gene expression in rat aorta. *J. Gerontol*, 1990;

- 45: B113-118.
18. Senior, R.P., Griffin, G.L., Mecham, R.P., Wrenn, D.S., Prasad, K.U., Urry, D. W. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J. Cell Biol.*, 1984; 99: 870-874.
 19. 前田衣織：しなやかな身体とエラスチン、pp. 266, 女性の疾患と美容のための機能性素材の開発 山地亮一監 修 CMC 出版 (2014)
 20. Miller, E.J., Fullmer, H.M. Elastin: diminished reactivity with aldehyde reagents in copper deficiency and lathyrism. *J. Exp. Med.*, 1966; 123: 1097-1108.
 21. Ross, R, Bornstein, P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol.*, 1969; 40: 366-81.
 22. Richmond, V. Lung parenchymal elastin isolated by non-degradative means. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1974; 351: 173-7.
 23. Rasmussen, B.L., Bruenger, E., Sandberg, L.B. A new method for purification of mature elastin. *Anal Biochem.*, 1975; 64: 255-259.
 24. Serafini-Fracassini, A., Field, J.M., Rodger, G.W., Spina, M. Application of affinity chromatography to the purification of collagenase for the isolation of insoluble elastin. *Biochim Biophys Acta.*, 1975; 386: 80-86.
 25. Keeley, F.W., Labella, F.S. Amino Acid Composition of Elastin in the Developing Chick Aorta. *Connec. Tissue Res.*, 1972; 1: 113-119.
 26. Keeley, F.W., Fagan, D.G., Webster, S.I. Quantity and character of elastin in developing human lung parenchymal tissues of normal infants and infants with respiratory distress syndrome. *J. Lab. Clin. Med.*, 1977; 90: 981-989.
 27. Desai, R., Wigglesworth, J.S., Aber, V. Assessment of elastin maturation by radioimmunoassay of desmosine in the developing human lung. *Early Hum. Dev.*, 1988; 16: 61-71.
 28. 上村裕子, 岡元孝二, 田中幸男, 生化学, 1989; 61: 1312.
 29. 公益財団法人 日本健康・栄養食品協会：認定健康食品（JHFA）解説書：エラスチン食品, 2012.
 30. Hunninghake, G.W., Davidson, J.M., Rennard, S., Szapiel, S., Gadek, J.E., Crystal, R.G. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science*, 1981; 212: 925-927.
 31. Uemura, Y., Okamoto, K. Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1997; 41:1085-1092.
 32. Kamisato, S., Uemura, Y., Takami, N., Okamoto, K. Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J. Biochem.*, 1997; 121: 862-867.

33. Broekelmann, T.J., Kozel, B.A., Ishibashi, H., Werneck, C.C., Keeley, F.W., Zhang, L., Mecham, R.P. Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 40939-40947.
34. Urry, D.W., Harris, R.D., Long, M.M. Compounding of elastin polypentapeptide to collagen analogue: a potential elastomeric prosthetic material. *Biomater. Med. Devices Artif. Organs*, 1981; 9: 181-94.
35. Urry, D.W. Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1992; 57: 23-57.
36. Urry, D.W., Gowda, D.C., Parker, T.M., Luan, C.H., Reid, M.C., Harris, C.M., Pattanaik, A., Harris, R.D. Hydrophobicity scale for proteins based on inverse temperature transitions. *Biopolymers*, 1992; 32: 1243-1250.
37. Maeda, I., Fukumoto, Y., Nose, T., Shimohigashi, Y., Nezu, T., Terada, Y., Kodama, H., Kaibara, K., Okamoto, K. Structural requirements essential for elastin coacervation: favorable spatial arrangements of valine ridges on the three-dimensional structure of elastin-derived polypeptide (VPGVG)_n. *J. Pept. Sci.*, 2011; 17: 735-743.
38. Rapaka, R.S., Okamoto, K., Urry, D.W. Coacervation properties in sequential polypeptide models of elastin. Synthesis of H-(Ala-Pro-Gly-Gly)_n-Val-OMe and H-(Ala-Pro-Gly-Val-Gly)_n-Val-OMe. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1978; 12: 81-92.
39. Urry, D.W. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics. *J. Protein Chem.*, 1988; 7: 1-34.
40. Urry, D.W., Jaggard, J., Prasad, K.U., Parker, T., Harris, R.D. Poly (VAL¹-PRO²-ALA³-VAL⁴-GLY⁵): A Reversible, Inverse Thermoplastic. In *Biotechnology and Polymers* (CG. Gebelein, Ed.), Plenum Press, New York, 265-274, 1991.
41. Schmidt, P., Dybal, J., Rodriguez-Cabello, J.C., Reboto, V. Role of water in structural changes of poly(AVGVP) and poly(GVGVP) Studied by FTIR and Raman spectroscopy and ab initio calculations. *Biomacromolecules*, 2005; 6: 697-706.
42. Hasegawa, M., Kawasaki, T., Saito, M., Ito, H., Okamoto, K., Arai, C., Kashiwakura, Y., Yoshimura, S. Determination of aortic medial tissue elastin and collagen in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 1981; 18: 336-41.
43. Okamoto, K., Yamada, H., Maeda, I. Water-soluble elastins, process for producing the same, and food and medicine containing the same. world patent WO2006046626 A1, May 4, 2006.
44. 中場操子, 小池田崇史, 斎藤安弘, カツオエラスチン含有サプリメントのヒト肌に対する有用性検討. *新薬と臨床*, 2007; 56: 1881-1887.
45. 早川徹, 佐藤三佳子, 雑賀(江草)愛, 高畑能久, 森松文毅, 野村義宏, ブタ由来エラスチンペプチドの経口摂取によるマウス皮膚水分含量の向上. *日本畜産学会報*,

- 2009; 80: 215-222.
46. 岡元孝二, 柿野賢一, 堀祐輔, エラスチン・コラーゲン併用摂取による肌質改善効果の検証. *新薬と臨床*, 2011; 60: 639-650.
 47. Masaki, H., Overview of Functional Cosmetics. *薬剤学*, 2015; 75: 313-316.
 48. Maeda, K., Fukuda, M. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1991; 42: 361-368.
 49. 寺田弘: 薬の効き方・効かせ方, オーム社, 82-123 (2009)
 50. 堀内孝: 医用材料工学, コロナ社, 1-7 (2010)
 51. Pierna, M., Santos, M., Arias, F.J., Alonso, M., Rodríguez-Cabello, J.C. Efficient cell and cell-sheet harvesting based on smart surfaces coated with a multifunctional and self-organizing elastin-like recombinamer. *Biomacromolecules*, 2013; 14: 1893-903.
 52. 関根和希, 清水達也, 細胞シートによる再生医療ー効率的な細胞デリバリーシステム. *医学のあゆみ*, 2009; 229 (9): 748-752
 53. CMP ジャパン編: 食品と開発, 44 (3), 21-44 (2009)
 54. Nakaba, M. Ogawa, K., Seiki, M., Kunimoto, M. Properties of soluble elastin peptide from bulbus arteriosus in fish species. *Fisheries Science*, 2006; 72:1322-1324.
 55. 白土絵里: 九州工業大学博士学位論文 (2011)
 56. Braun, M.H., Brill, R.W., Gosline, J.M., Jones, D.R. Form and function of the bulbus arteriosus in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*): static properties. *J. Exp. Biol.*, 2003; 206: 3311-3326.
 57. Kaibara, K., Miyakawa, K., Okamoto, K., Uemura, Y., Kondo, M. Devenopment of Biomaterials Corresponding to Coaoervate Characteristics. *Kobunshi Ronbunshu*, 1991; 48: 311-317.
 58. Ohara, H., Ichikawa, S., Matsumoto, H., Akiyama, M., Fujimoto, N., Kobayashi, T., Tajima, S. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts, *J. Dermatol.*, 2010; 37: 330-338.
 59. Spier, H.W., Pascher, G. Analytical and functional physiology of the skin surface, *Hautarzt*, 1956; 7: 55-60.
 60. Bos, J.D., Meinardi, M.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, 2000; 9: 165-169.
 61. Brown, T.J., Alcorn, D., Fraser, J.R. Absorption of hyaluronan applied to the surface of intact skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1999; 113: 740-746.
 62. Kawada, C., Yoshida, T., Yoshida, H., Sakamoto, W., Odanaka, W., Sato, T., Yamasaki, T., Kanemitsu, T., Masuda, Y., Urushibata, O. Ingestion of hyaluronans (molecular weights 800 k and 300 k) improves dry skin conditions: a randomized, double blind, controlled study. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2015; 56: 66-73.

63. Hakozaiki, T., Minwalla, L., Zhuang, J., Chhoa, M., Matsubara, A., Miyamoto, K., Greatens, A., Hillebrand, G.G., Bissett, D.L., Boissy, R.E., The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br. J. Dermatol.*, 2002; 147: 20-31.
64. Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T., Murao, S. Effects of alpha- and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995; 59: 143-144.
65. Briganti, S., Camera, E., Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.*, 2003; 16: 101-110.
66. Prota, G., Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.*, 1980; 75: 122-127.
67. Kobayashi, T., Vieira, W.D., Potterf, B., Sakai, C., Imokawa, G., Hearing, V.J. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell. Sci.*, 1995; 108: 2301-2309.
68. Riley, P.A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 1235-1239.
69. Hearing, V.J., Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991; 5: 2902-2939.
70. Tomoda, Y., Tsuda, M. Some aspects of the crosslinking and degradation of gelatin molecules in aqueous solution irradiated by ^{60}Co γ -rays. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1961; 321-328.
71. Bessho, M., Furuta, M., Kojima, T., Okuda, S., Hara, M. Gelatin hydrogel cross-linked by γ -ray irradiation: materials for absorption and release of dye. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 2005; 16: 715-724.
72. Kojima, T., Bessho, M., Furuta, M., Okuda, S., Hara, M. Characterization of biopolymer hydrogels produced by γ -ray irradiation, *Radiation Physics and Chemistry*, 2004; 71: 235-238.
73. 原子力委員会食品照射専門部会：食品への放射線照射について、平成 18 年 9 月 (2006)
74. Paisan, L., Mainuddin, A. Advantages and disadvantages of the use of irradiation for food preservation. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 1991; 4: 14-30.
75. 食品総合研究所：平成 16 年度食品安全確保総合調査「放射線照射食品の安全性に関する文献等の収集・整理などの調査報告書」(2005)
76. 世界保健機関 (WHO)：Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group HIGH-DOSE IRRADIATION: WHOLESOMENESS OF FOOD IRRADIATED WITH DOSE ABOVE 10 kGy, WHO Technical Report Series 890 (1999)
77. Gardais, A., Picard, J., Hermelin B. Glycosaminoglycan (GAG) distribution in aortic wall from five species. *Comp. Biochem. Physiol.* 1973; 44B: 507-515.

78. Yao, Y., Laminin: loss-of-function studies. *Cell Mol. Life Sci.*, 2016 [Epub ahead of print].
79. Jara, J.R., Aroca, P., Solano, F., Martinez, J.H., Lozano, J.A. The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine and glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988; 967: 296-303.
80. Tseng, T.S., Tsai, K.C., Chen, W.C., Wang, Y.T., Lee, Y.C., Lu, C.K., Don, M.J., Chang, C.Y., Lee, C.H., Lin, H.H., Hsu, H.J., Hsiao, N.W. Discovery of Potent Cysteine-Containing Dipeptide Inhibitors against Tyrosinase: A Comprehensive Investigation of 20 × 20 Dipeptides in Inhibiting Dopachrome Formation. *J. Agric. Food Chem.*, 2015; 63: 6181-6188.
81. Maeda, I., Taniguchi, S., Watanabe, N., Inoue, A., Yamasaki, Y., Nose, T. Design of Phenylalanine-Containing Elastin-Derived Peptides Exhibiting Highly Potent Self-Assembling Capability. *Protein Pept. Lett.*, 2015; 22: 934-939.
82. 前田衣織、野瀬 健：ペプチドおよびその自己集合方法、その集合体、これらを用いた細胞培養基材、並びに、細胞シートの製造方法 (P150011544)
83. Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukharensko, V., Verlinsky, Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online*, 2004; 9: 623-629.
84. Iwanaga, A., Endo, M., Maeda, I., Okamoto, K. Study on self-assembly of pentapeptide repeating sequence in tropoelastin. *Peptide Science 2006*, 2006; 290-291.
85. Maeda, I., Taniguchi, S., Ebina, J., Watanabe, N., Hattori, T., Nose, T. Comparison between coacervation property and secondary structure of synthetic peptides, Ile-containing elastin-derived pentapeptide repeats. *Protein Pept. Lett.*, 2013; 20: 905-910.
86. Antoniou, C., Schulpis, H., Michas, T., Katsambas, A., Frajis, N., Tsagaraki, S., Stratigos J. Vitiligo therapy with oral and topical phenylalanine with UVA exposure. *Int. J. Dermatol.*, 1989; 28: 545-547.
87. Sylvestre, J.P., Bouissou, C.C., Guy, R.H., Delgado-Charro, M.B. Extraction and quantification of amino acids in human stratum corneum in vivo. *Br. J. Dermatol.*, 2010; 163: 458-465.
88. Tajima, S., Wachi, H., Uemura, Y., Okamoto, K. Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 1997; 289: 489-492.
89. Shiratsuchi, E., Ura, M., Nakaba, M., Maeda, I., Okamoto, K. Elastin peptides prepared from piscine and mammalian elastic tissues inhibit collagen-induced platelet aggregation and stimulate migration and proliferation of human skin fibroblasts, *J. Pept. Sci.*, 2010; 16: 652-658.
90. Koga, T., Nakamoto, K., Odawara, K., Matsuoka, T., Higashi, N. Fabrication of Thermo-Responsive Molecular Layers from Self-Assembling Elastin-Like Oligopeptides

- Containing Cell-Binding Domain for Tissue Engineering, *Polymers*, 2015; 7: 134-146.
91. Steiner, D., Bedin, V., Moraes, M.B., Villas, R.T., Steiner, T. Vitiligo. *An Bras. Dermatol.*, 2004; 79: 335--351.
 92. Chang, C.H., Kawa, Y., Tsai, R.K., Shieh, J.H., Lee, J.W., Watabe, H., Kawakami, T., Soma, Y., Tajima, S., Mizoguchi, M. Melanocyte precursors express elastin binding protein and elastin-derived peptide (VGVPAG) stimulates their melanogenesis and dendrite formation. *J. Dermatol. Sci.*, 2008; 51: 158-170.